



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA COMPARATIVA DEL QUESO DE HOJA TRADICIONAL ELABORADO EN UNA PLANTA INDUSTRIAL Y EN UNA ARTESANAL DE LA CIUDAD DE LATACUNGA”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: JHOANA PAOLA VARGAS CALI

TUTORA: DRA. ANA ALBUJA, MSc.

Riobamba – Ecuador

2018

© **2018**, Jhoana Paola Vargas Cali

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA COMPARATIVA DEL QUESO DE HOJA TRADICIONAL ELABORADO EN UNA PLANTA INDUSTRIAL Y EN UNA ARTESANAL DE LA CIUDAD DE LATACUNGA”, de responsabilidad de la señorita Jhoana Paola Vargas Cali, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dra. Ana Albuja, M.Sc.

**DIRECTORA DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Ing. Paola Arguello, MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Jhoana Paola Vargas Cali, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Jhoana Paola Vargas Cali
060412491-7

DEDICATORIA

Al forjador de mi camino, Dios, por ser mi soporte fundamental para seguir adelante a pesar de las adversidades.

A mi madre, María Santos, por su amor incondicional, paciencia, y esfuerzo para que yo pueda tener una profesión.

A mis hermanos, Eddy, Katherine, Mariela, Gabriela, Alex, Danny, Samaris, por su inmenso cariño y por ser la inspiración para alcanzar mis metas.

A mi familia por ser el ejemplo de lucha y superación, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera.

Jhoana Paola

AGRADECIMIENTO

El más sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por contribuir en mi formación profesional.

Agradezco profundamente a la Dra. Anita Albuja y a la Ing. Paola Arguello, por su increíble calidad humana, por haberme ofrecido su conocimiento, tiempo y apoyo totales para la culminación del presente trabajo de titulación.

Quiero agradecer a la Dra. Janeth Gallegos, por su valioso acompañamiento durante toda la realización del proyecto de titulación, ayudándome siempre con su valiosa experiencia y conocimientos.

Al grupo de Investigación de Seguridad y Soberanía Alimentaria, SAGID, por brindarme toda la apertura para la realización del presente proyecto de investigación

Jhoana Paola

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BAL	Bacterias ácido lácticas
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CE	Comunidad Europea
DOP	Denominación de origen protegida
ETA	Enfermedad transmitida por alimentos
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
MRS	Medio de cultivo de Man Rogosa Shape
NSBAL	Bacterias ácido lácticas no iniciadoras
ONG	Organizaciones no gubernamentales
QHA	Queso de hoja artesanal
QHI	Queso de hoja industrial
UE	Unión Europea

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1 Queso.....	4
1.2 Leche.....	4
1.2.1 Clasificación de los quesos	4
1.2.1.1 Quesos artesanales	4
1.2.1.2 Quesos industriales.....	5
1.3 Queso de hoja	5
1.3.1 Proceso de elaboración	6
1.4 Quesos de pasta hilada	6
1.4.1 Proceso de elaboración	7
1.5 Microbiología de los quesos	7
1.5.1 Microorganismos patógenos	8
1.5.1.1 Microorganismos aerobios mesófilos.....	9
1.5.1.2 Enterobacteriaceae.....	9
1.5.1.3 Coliformes	9
1.5.1.4 Coliformes fecales	10
1.5.1.5 Escherichia coli	10
1.5.1.6 Staphylococcus aureus	11
1.5.2 Microorganismos causantes de deterioro	11
1.5.2.1 Defectos causados por BAL.....	12
1.5.2.2 Defectos causados por microorganismos psicrófilos	12
1.5.2.3 Defectos causados por las bacterias coliformes.....	12
1.5.2.4 Defectos causados por bacterias formadoras de esporas	12
1.5.2.5 Defectos causados por las bacterias corineformes, levaduras y mohos	13
1.5.3 Microorganismos beneficiosos	13
1.5.3.1 Bacterias ácido lácticas.....	13
1.5.3.2 Tipos de fermentación	14

1.5.3.3	<i>Bacterias ácido lácticas iniciadoras</i>	15
1.5.3.4	<i>Bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB)</i>	16
1.5.4	Principales géneros de BAL	17
1.5.4.1	<i>Lactobacillus</i> spp.....	19
1.5.4.2	<i>Lactococcus</i> spp.....	19
1.5.4.3	<i>Streptococcus</i> spp.	20
1.5.4.4	<i>Enterococcus</i> spp.....	20
1.5.5	Beneficios de las BAL	21

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	22
2.1	Lugar de la investigación	22
2.2	Factores de estudio	22
2.2.1	<i>Población</i>	22
2.2.2	<i>Muestra</i>	22
2.3	Materiales, equipos y reactivos	23
2.4	Técnicas y métodos	24
2.4.1	<i>Toma y transporte de muestras</i>	24
2.4.2	<i>Muestreo de queso de hoja artesanal</i>	24
2.4.3	<i>Muestreo de queso de hoja industrial</i>	24
2.5	Análisis microbiológicos	25
2.5.1	<i>Preparación de diluciones</i>	25
2.5.2	<i>Control de calidad</i>	25
2.5.2.1	<i>Recuento de microorganismos aerobios mesófilos</i>	25
2.5.2.2	<i>Recuento de bacterias coliformes, Escherichia coli y Staphylococcus aureus.</i>	26
2.5.2.3	<i>Disco de confirmación 3M para Staphylococcus aureus.</i>	27
2.5.3	<i>Recuento de bacterias ácido lácticas</i>	27
2.5.4	<i>Aislamiento de BAL</i>	28
2.5.4.1	<i>Aislamiento de bacilos</i>	28
2.5.4.2	<i>Aislamiento de cocos</i>	29
2.5.5	<i>Pruebas bioquímicas para el aislamiento</i>	29
2.5.5.1	<i>Tinción de Gram</i>	29
2.5.5.2	<i>Prueba de catalasa</i>	29
2.5.5.3	<i>Prueba de oxidasa</i>	29
2.5.6	<i>Pruebas de caracterización</i>	30
2.5.6.1	<i>Prueba de movilidad</i>	30

2.5.6.2	<i>Producción de CO₂ a partir de glucosa</i>	30
2.5.6.3	<i>Crecimiento a diferentes temperaturas</i>	31
2.5.6.4	<i>Tolerancia al cloruro sódico</i>	31
2.5.6.5	<i>Tolerancia a diferentes pH</i>	32
2.5.7	<i>Conservación de las cepas</i>	32

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	33
3.1	Análisis microbiológico de los quesos de hoja artesanal e industrial.....	33
3.1.1	<i>Recuentos de aerobios mesófilos</i>	33
3.1.2	<i>Recuentos de coliformes y Escherichia coli</i>	35
3.1.3	<i>Recuentos de Staphylococcus aureus</i>	37
3.2	Resultados del recuento de bacterias ácido lácticas	39
3.3	Aislamiento y selección de cepas de bacterias ácido lácticas	42
3.3.1	<i>Pruebas de caracterización de los aislados en MRS</i>	43
3.3.2	<i>Pruebas de caracterización de los aislados en M17</i>	46
	CONCLUSIONES.....	50
	RECOMENDACIONES.....	51
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	8
Tabla 2-1:	Géneros comunes BAL y sus características diferenciales.....	18
Tabla 1-2:	Materiales, equipos, reactivos usados en los análisis microbiológicos.....	23
Tabla 2-2:	Medio de cultivo.....	24
Tabla 3-2:	Lugares de muestreo QHA.....	24
Tabla 4-2:	Productos “Queso de Hoja Industrial”	25
Tabla 5-2:	Condiciones d crecimiento microbiano en placas Petrifilm.....	26
Tabla 6-2:	Características de identificación en placas Petrifilm.....	27
Tabla 7-2:	Ingredientes de caldo rojo fenol.....	31
Tabla 1-3:	Resultados del recuento de aerobios mesófilos en queso de hoja.....	33
Tabla 2-3:	Resultados dl recuento de coliformes y <i>Escherichia coli</i> en queso de hoja.....	35
Tabla 3-3:	Resultados del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en queso de hoja.....	37
Tabla 4-3:	Recuento microbiano en MRS y M17.....	40
Tabla 5-3:	Total de cepas BAL aisladas.....	42
Tabla 6-3:	Caracterización de cepas aisladas en MRS.....	43
Tabla 7-3:	Caracterización de cepas aisladas en M17.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1:	Proceso de elaboración del queso de hoja artesanal.....	6
Gráfico 1-3:	Bacilos agrupados de acuerdo a sus características fisiológicas.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Esquema general de la fermentación de glucosa por las BAL.....	15
Figura 2-1:	Cinética de crecimiento de NSLAB y los "starters" o iniciadores.....	17
Figura 3-1:	Usos e ingredientes funcionales de las bacterias ácido lácticas.....	21

INDICE DE ANEXOS

Anexo A:	Queso de hoja tradicional de la ciudad de Latacunga
Anexo B:	Control de calidad del queso de hoja
Anexo C:	Aislamiento de bacterias ácido lácticas
Anexo D:	Características microscópicas de las bacterias ácido lácticas
Anexo E:	Pruebas de caracterización de cepas BAL
Anexo F:	Total de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas en medios de cultivo MRS y M17.

RESUMEN

Se realizó la evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional de la ciudad de Latacunga elaborado de forma artesanal e industrial. Se recolectaron muestras en 3 periodos aleatorios. Se realizaron recuentos microbiológicos para aerobios mesófilos (NTE INEN 1529-5), coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* utilizando placas Petrifilm™ 3M™. Se realizó el recuento de bacterias ácido lácticas en medios de cultivo selectivos MRS y M17 tomando como referencia la metodología (PRT-712.02-047). El aislamiento de bacterias ácido lácticas se realizó en base a la morfología macroscópica, microscópica, prueba de catalasa, oxidasa y movilidad. El crecimiento de las cepas fue evaluado a diferentes condiciones: temperatura (10°C y 45°C), concentración de NaCl (6.5% y 18%), pH (4.4 y 9.6) y la formación de CO₂ a partir de glucosa. Finalmente, las cepas fueron conservadas en glicerol al 30% a -20°C para pruebas de identificación posteriores. Los resultados revelaron que el queso de hoja producido a nivel industrial cumple con los requisitos microbiológicos de la norma NTE INEN 1528, a diferencia del queso de hoja artesanal que incumple dichos parámetros pudiendo representar un riesgo para la salud del consumidor. Los recuentos de bacterias ácido lácticas en medios MRS y M17 fueron más altos en el queso de hoja artesanal, sin embargo, incumple los criterios de calidad microbiológicos. Al final del aislamiento se seleccionaron 32 cepas de bacterias ácido lácticas; bacilos (56,25%) y cocos (43,75%), las cuales fueron Gram positivas, catalasa, oxidasa y movilidad negativas. Las pruebas de caracterización diferenciales, mostraron que el 50% de las cepas aisladas en MRS podrían corresponder al género *Lactobacillus* y las cepas aisladas en M17 al género *Enterococcus*. Sin embargo, son necesarias pruebas de identificación bioquímica y genética.

PALABRAS CLAVE: <BIOQUIMICA> <MICROBIOLOGIA> EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA> <QUESO DE HOJA> <PROCESO INDUSTRIAL> <CONTROL DE CALIDAD> <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS> <LATACUNGA (CANTÓN)>

SUMMARY

The microbiologic comparative evaluation of the traditional leaf cheese from Latacunga city elaborated in an artisan and industrial way was carried out. The samples were collected at random periods. The microbiological count was conducted to aerobic mesophilic (NTE INEN 1592-5), total coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* using 3M™ Petrifilm™. The lactic acid bacteria count was carried out in selective media of cultivation MRS and M17 taking as a reference the methodology (PRT-712.02-047). The isolation of the lactic acid bacteria was conducted based on the macroscopic morphology, microscopic, catalase test, oxidase, and motility. The strain growth was evaluated in different conditions of temperature (10°C and 45°C), NaCl concentration (6.5% and 18%), pH (4.4 and 9.6) and the formation of CO₂ from glucose. Finally, the strains were stored in 30% glycerol at -20°C for subsequent identification test. The results showed that the leaf cheese produced at the industrial level meets the microbiological requirements of the standard NTE INEN 1528, unlike the artisanal leaf cheese, therefore failed to meet the microbiological criteria. At the end of the isolation, it was selected 32 lactic acid bacteria strains, (56,25%) bacillus, and cocci (43,75%) which were Gram positive, catalase, oxidase, and motility negative. The test of differential characterization showed that 50% of isolated strains in MRS could belong to *Lactobacillus* genus and isolated strains in M17 to *Enterococcus* genus. However, it is necessary biochemistry and genetic test.

KEYWORDS: <BIOCHEMISTRY> <MICROBIOLOGY> <MICROBIOLOGY
EVALUATION> <LEAF CHEESE> <INDUSTRIAL PROCESS> <QUALITY CONTROL>
<LACTIC ACID BACTERIA> <LATACUNGA (CANTON)>

INTRODUCCIÓN

La producción de leche del Ecuador contabilizó un total de 5.60 millones de litros en el 2014, de los cuales la región Sierra fue la principal productora. Más de un tercio de la leche diaria procesada se dedica a la producción de queso (INEC, 2016).

Ecuador es un país que no tiene una fuerte tradición quesera, sin embargo, existen muchas comunidades que elaboran queso, para consumo local y comercializan a pequeña escala sus productos. Algunas trabajan bajo la coordinación y capacitación de Organizaciones no gubernamentales (ONG) para elaborar productos en mejores condiciones de higiene y calidad (Palacios, 2015, p. 2). En Ecuador es muy difundido el consumo de productos de origen artesanal como el queso de hoja tradicional de las ciudades de Latacunga y Cayambe.

La calidad microbiológica y la seguridad del queso comienzan con la leche. Por su abundancia de nutrientes y pH casi neutro, la leche sirve como un medio de crecimiento excelente para microorganismos beneficiosos como las bacterias ácido lácticas. Aunque, también permite el desarrollo de microorganismos contaminantes, asociados con el deterioro y defectos, y de los patógenos para los seres humanos (Donnelly, 2014, pp. 251-309).

El Ministerio de Salud Pública en 2008 registro más de 10000 casos de intoxicaciones producidas por alimentos; pero no se cuantificaron por alimentos o por microorganismos indicadores (Plaza, y Morales, 2013, pp. 1-9). La asociación de la leche y sus derivados con diversos microorganismos patógenos plantea la necesidad de intensificar los esfuerzos para garantizar la seguridad de estos productos (Ferrari, et al., 2016, pp. 1-35).

Los productos lácteos son excelentes medios de crecimiento para una amplia gama de microorganismos, por ello en ocasiones puede presentar problemas para la salud sino se tienen las medidas de higiene necesarias durante su procesamiento. Para promover los quesos artesanales es necesario contar con prácticas de manufactura estandarizadas y conocer las características finales del producto, las cuales se pueden lograr después de caracterización integral de los perfiles químicos, microbiológicos y sensoriales (Narváez, 2015, pp. 18-20).

El Plan Nacional del Buen Vivir en su objetivo 3 correspondiente al mejoramiento de la calidad de vida de la población, plantea:” Implementar acciones integrales para la disminución de la morbilidad y mortalidad por enfermedades transmisibles y crónicas no transmisibles o degenerativas de alta prioridad, y enfermedades evitables y desatendidas por consumo de alimentos contaminados ...” (Senplades, 2013, pp. 135-137).

La inocuidad de los alimentos sigue siendo un componente importante de la producción de alimentos tanto desde el punto de vista económico como desde el punto de vista de la salud pública (Ricke, et al., 2015, pp. 10-53). Las preocupaciones sobre la inocuidad y calidad de los alimentos, su producción, procesamiento y conservación han aumentado la importancia de la microbiología de los alimentos, ya que abarca el estudio de microorganismos que pueden tener efectos beneficiosos y nocivos sobre la calidad y la seguridad de los alimentos (Papademas, 2015, pp. 69-113).

La constitución de la República del Ecuador, en el artículo 13, ordena que: “Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente de alimentos sanos, suficientes y nutritivos, preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas entidades y tradiciones culturales.” (Ministerio de Salud Pública, 2013).

El queso es uno de los alimentos tradicionales que la humanidad ha estado preparando durante los últimos milenios (Papademas y Bintsis 2018, pp. 71-89). Los quesos tradicionales difieren en su tecnología de fabricación y en la flora microbiana que comprende los productos acabados. La evolución de la microflora láctica es de particular interés porque las actividades bioquímicas de estos organismos participan en la elaboración de quesos y pueden desempeñar un papel reconocido en el desarrollo de características organolépticas (Lortal, et al., 2014, pp. 1-11).

El queso es esencialmente una fermentación microbiana de la leche por bacterias ácido lácticas, cuya principal función es producir ácido láctico a partir de lactosa. Las bacterias del ácido lácticas (BAL) sintetizan muchos compuestos antimicrobianos, incluyendo ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico), peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, que pueden inhibir el deterioro y el crecimiento de bacterias patógenas. También contribuyen al sabor del queso y pueden jugar un papel probiótico (Golić et al., 2013, pp. 294-300).

Ecuador es un país mega diverso en culturas, climas, etnias que confluyen en un entorno único para la elaboración de muchos productos como el queso de hoja tradicional de Latacunga, elaborado artesanal e industrialmente. Por lo cual es importante realizar una evaluación microbiológica comparativa orientada al control de calidad, en base al recuento de microorganismos indicadores. Dentro de la evaluación microbiológica del queso de hoja, también es importante evaluar el contenido de bacterias ácido lácticas por medio del recuento, asilamiento y selección para una posible identificación en base a sus características fenotípicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar una evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional elaborado en una planta industrial y en una artesanal de la ciudad de Latacunga.

Objetivos Específicos

Determinar la calidad microbiológica del queso de hoja tradicional de Latacunga para conocer su inocuidad dependiendo del nivel de producción ya sea industrial o artesanal

Realizar el recuento de bacterias ácido lácticas presentes en el queso de hoja industrial y artesanal.

Aislar y seleccionar bacterias ácido lácticas provenientes del queso de hoja de acuerdo a las pruebas de tinción Gram, catalasa, oxidasa y movilidad.

Caracterizar las bacterias ácido lácticas aisladas de acuerdo a su desarrollo en diferentes temperaturas, pH, concentraciones de NaCl, producción de CO₂ a partir de glucosa.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Queso

El queso pertenece a la familia de productos lácteos fermentados que se remonta a la antigüedad. Se entiende por queso el producto obtenido mediante la coagulación total o parcial de la proteína de la leche, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como resultado de dicha coagulación, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche (NTE INEN 1528, 2012).

1.2 Leche

La leche es el ingrediente principal utilizado en la fabricación del queso, de acuerdo a la norma para queso fresco no madurado, “*Se define como leche al producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo*” (NTE INEN 0009, 2012).

1.2.1 Clasificación de los quesos

La diversidad de quesos existentes es realmente impresionante. Hay quesos de todas las formas y sabores. Para facilitar su estudio, se han realizado varios intentos de clasificarlos en familias significativas, atendiendo a sus características físico químicas, propiedades reológicas, métodos de fabricación, origen de la leche, etc. (Fox et al., 2017, pp. 9-87). A continuación, se presenta la clasificación de los quesos de acuerdo a su nivel de producción:

1.2.1.1 Quesos artesanales

De acuerdo a la American Cheese Society, “la palabra “artesano” o “artesanal” implica que un queso es producido principalmente a mano, en pequeños lotes, con especial atención a la tradición

del arte del quesero, y por lo tanto usando la menor mecanización posible en la producción del queso (American Cheese Society, 2012) ”.

"Artesanal" es un término utilizado para describir sistemas de producción que son relativamente a pequeña escala y donde el trabajo manual y el juicio experto e intuitivo del fabricante tienen prioridad sobre los métodos mecanizados y automáticos. En Europa, los quesos artesanales generalmente se asocian con un territorio o localidad particular, y se basan en la combinación única de variables ambientales (por ejemplo, el clima, tipo de suelo, flora, fauna, tipo de microorganismos) y patrimonio cultural. Los quesos artesanales tienden a mostrar una mayor variabilidad en comparación con sus contrapartes producidas en fábrica y se caracterizan por sus características organolépticas distintivas de sabor, olor y textura (Donnelly, 2016, pp. 43-45).

1.2.1.2 Quesos industriales

La "fabricación industrial de quesos" se refiere al proceso a gran escala y completamente automatizado; las recetas se programan en computadoras y la fabricación de queso se lleva a cabo de acuerdo con un plan prescrito en cubas cerradas que restringen la vista de la leche y la cuajada. Los trabajadores de la fábrica asisten a la transformación de la leche en queso de forma higiénica, mientras que el conocimiento y la destreza del queso se materializan lejos de la fábrica, en investigación y diseño y en control de calidad (Paxson, 2013, pp. 128-157).

En la actualidad, los productores de quesos industriales operan utilizando tecnologías en cada paso del proceso de elaboración eliminando en gran medida a los seres humanos del manejo de la leche y la cuajada. Esto permite que se produzcan grandes volúmenes de queso, pero dichos productos no están destinados a alcanzar la gama completa de sabores disponibles a través de métodos artesanales. Sin embargo, todavía hay muchos fabricantes de quesos que combinan las prácticas tradicionales e industriales para controlar la calidad del producto (Donnelly, 2016, pp. 376-379).

1.3 Queso de hoja

La norma NTE INEN 1528 para quesos frescos no madurados define al queso de hoja como: “*queso no madurado obtenido a partir de queso criollo acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de Ecuador no patógenas; sometido al calentamiento previo al hilado.*”

La característica es su envoltura en hoja de achira” (NTE INEN 1528, 2012). El queso de hoja es un queso tradicional de las ciudades de Cayambe y Latacunga del Ecuador.

1.3.1 Proceso de elaboración

El queso de hoja se elabora a partir del queso criollo y de forma artesanal tiene el siguiente proceso de elaboración:

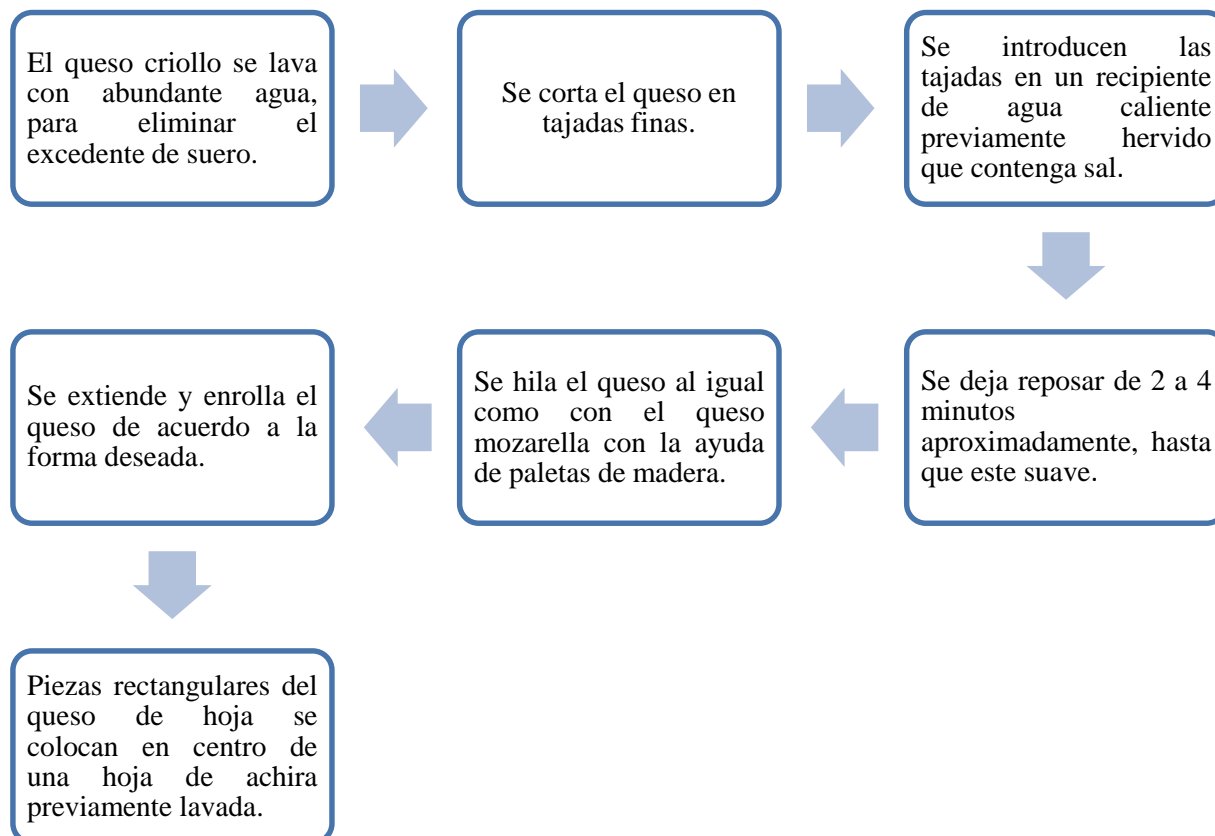


Gráfico 1-1: Proceso de elaboración del queso de hoja artesanal.
Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

1.4 Quesos de pasta hilada

Los quesos de pasta hilada son variedades blandas o semiduras, cuyas cuajadas se calientan a $\geq 65^{\circ}\text{C}$ en agua caliente ($70-80^{\circ}\text{C}$) y se estiran mecánicamente durante la fabricación (Fox et al. 2017, pp. 9-87). El queso mozzarella es el miembro más representativo de este grupo, originalmente hecho en Italia con leche de búfala, es ahora fabricado y consumido en todo el mundo (Batt y Tortorello 2014; McSweeney, et al., 2017).

Actualmente el término mozzarella hace referencia a un queso fresco hecho con leche de vaca, su nombre deriva de la frase italiana mozzare que significa “separar”, haciendo referencia a su capacidad de estiramiento. Aunque la versión original del mozzarella con DOP “denominación de origen protegida”, está hecha con leche de búfala, hoy en día la mayoría de los consumidores solo conocen la versión mozzarella fabricada con leche de vaca, pudiendo encontrar en los mercados diversas versiones, desde queso industrial, seco y gomoso usado principalmente en pizza, hasta quesos elaborados localmente, consumidos en fresco (Donnelly, 2016, pp. 498-501).

1.4.1 Proceso de elaboración

Generalmente los quesos mozzarella se elaboran siguiendo procesos similares que varían de acuerdo a las características deseadas en el producto final. Hoy en día, la mayoría de los fabricantes de mozzarella usan leche de vaca semidesnatada y pasteurizada en la fabricación. Durante el proceso de elaboración se adiciona cuajo, la cuajada se corta y se trata térmicamente a 41°C. El suero de leche se drena y la textura deseada de la cuajada se logra acidificándola a un pH de 5.1 a 5.3. La mozzarella se estira en agua a unos ~70°C, hasta lograr la textura y forma deseada, se puede salar durante el estiramiento o a su vez sumergiéndola en salmuera (Pintado, et al., 2015, pp. 113-133).

Todos los quesos de pasta hilada comparten un paso de procesamiento único hacia el final de la fabricación, cuando la cuajada se sumerge en agua caliente y se trabaja (estira) manual o mecánicamente a una consistencia plástica que se puede moldear en una variedad de formas (Fuquay, et al., 2011, pp. 534,745). En una escala artesanal, un palo de madera o espátula de madera se usa para ayudar al estiramiento, a menudo se hace incluso a mano a altas temperaturas. En la producción a gran escala, el proceso esta automatizado con maquinaria (Donnelly, 2016, p. 43-45).

1.5 Microbiología de los quesos

Sin duda, la calidad de cualquier tipo de queso está influenciada por la calidad de la leche a partir de la cual se elabora (McSweeney, et al., 2017, pp. 251-278). La microbiología de los quesos es muy diversa, está formada por microorganismos beneficiosos que contribuyen a la formación del queso, pero también pueden encontrarse microorganismos patógenos, o asociados al deterioro (Fox et al. 2017, pp. 9-87). La contaminación microbiana es todavía considerada como el factor de riesgo más crítico de los alimentos. Esta contaminación representa un problema para el quesero, ya que la leche de alta calidad microbiológica es importante para lograr un rendimiento, calidad y seguridad óptimos del queso (Donnelly, 2014, pp. 251-319).

La leche y por lo tanto el queso pueden contener tres categorías de bacterias:

- Bacterias patógenas
- Bacterias causantes de deterioro
- Bacterias beneficiosas

Requisitos microbiológicos

La norma NTE INEN 1528 para queso fresco, establece los siguientes requisitos de microbiológicos, relacionados con la calidad del producto.

Tabla 1-1: Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	N	M	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991, 14
<i>Staphylococcus aureus</i> , UFC/g	5	10	10^2	1	NYE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	5	Ausencia	-		ISO 11290-1
<i>Salmonella</i> en 25g	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
n= número de muestras a examinar. m= índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad. M= índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad. c= número de muestras permisibles con resultados entre m y M.					

Fuente: (NTE INEN 1528, 2012)

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

1.5.1 Microorganismos patógenos

Es importante tomar en cuenta la definición de “organismo marcador” que posee dos funciones diferentes de “organismo índice” que está relacionado, directa o indirectamente, con los peligros para la salud o con la presencia de patógenos, y por otro lado los “organismos indicadores” que son utilizados para evaluar el estado microbiológico de la producción de alimentos, es decir sirven para validar la efectividad de los tratamientos aplicados a los alimentos para reducir la carga microbiana (Corry, et al., 2012, pp. 174-186).

1.5.1.1 *Microorganismos aerobios mesófilos*

La enumeración de células viables totales es un análisis ampliamente utilizado para proporcionar una idea del rendimiento general de la calidad microbiológica de los alimentos, sin especificar el tipo de microorganismos. Se utiliza como un indicador de calidad de los alimentos, y puede servir para reflejar la calidad sanitaria de un alimento, buena higiene personal y ambiental, las correctas prácticas de manipulación, además de las condiciones higiénicas de la materia prima (Batt y Tortorello 2014; Cano 2006).

Un conteo total de células viables solo puede proporcionar una estimación de la población microbiana basada en aquellas células que son recuperables bajo las condiciones de la prueba. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estos recuentos son indicadores deficientes de seguridad porque no se correlacionan directamente con la presencia de patógenos o toxinas. Un recuento bajo no significa que el producto o ingrediente esté libre de patógenos. Aunque, algunos productos que muestran recuentos excesivos o inusualmente altos se pueden suponer razonablemente como posibles riesgos para la salud (Batt y Tortorello 2014, pp. 610-636).

1.5.1.2 *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* abarca aproximadamente 20 géneros, incluyendo *E. coli* y todos los miembros del grupo coliforme. Además, incluye los patógenos alimentarios *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. La familia fue propuesta originalmente como un indicador alternativo al grupo coliforme porque las pruebas para toda la familia serían más inclusivas para las bacterias patógenas. El factor determinante que separa los coliformes es su capacidad de fermentar la lactosa ya que la familia *Enterobacteriaceae* fermenta la glucosa (Batt, C; Tortorello 2014). Además, la prueba para *Enterobacteriaceae* en lugar de coliformes es una prueba más sensible para la contaminación posterior a la pasteurización, ya que detecta todas las bacterias Gram-negativas sensibles al calor que no forman esporas, y proporciona una buena evidencia de que ha ocurrido contaminación (Britz y Robinson, 2008, pp. 212-220).

1.5.1.3 *Coliformes*

Los coliformes son bacterias Gram-negativas en forma de bastón, oxidasa negativa, no formadoras de esporas, aerobias o anaerobias facultativas que conforman un conjunto de bacterias (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*) no reconocidas como un grupo taxonómicamente distinto

válido, pero están funcionalmente definidas como microorganismos que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido a 35°C (Batt y Tortorello 2014; Donnelly 2014).

Muchas de estas bacterias se encuentran de forma natural en los intestinos de los humanos y animales, algunas incluso en el suelo y agua. Sin embargo, del 1% de coliformes que encuentran naturalmente en los intestinos humanos, *E. coli* representa la gran mayoría. Por lo tanto, una prueba de coliformes positiva no necesariamente indica contaminación fecal. Las bacterias coliformes se consideran organismos indicadores porque su presencia en los alimentos indica que las circunstancias son adecuadas para la presencia de patógenos entéricos (Britz y Robinson, 2008, pp. 212-220). El ensayo de coliformes es usado ampliamente en la industria de los lácteos como un microorganismo indicador que demuestra que hubo fallas en el proceso y recontaminación del producto. Dicha contaminación puede ser el resultado del uso de equipos insuficientemente limpios y desinfectados o por errores en el proceso de pasteurización (Batt y Tortorello, 2014, p. 659-666).

1.5.1.4 *Coliformes fecales*

Estos organismos son un subconjunto del grupo de coliformes totales que comparten las mismas propiedades con la diferencia de que la fermentación de la lactosa es a 44.5-45.5°C (Donnelly, 2014; Batt y Tortorello, 2014).

Las bacterias coliformes fecales pueden ser indicativas de contaminación fecal y la posible presencia de patógenos asociados con material fecal de animales de sangre caliente (por ejemplo, *Salmonella*, *E. coli* O157: H7, etc.). Se consideran un mejor indicador de contaminación fecal que el grupo coliforme. Es aplicada en algunos productos, como los lácteos, alimentos para bebés, helados y aguas minerales (Batt y Tortorello 2014, p. 659-666).

Adicionalmente a la enumeración de microorganismos contaminantes e indicadores, los productos lácteos necesitan ser examinados para la presencia de ciertas bacterias patógenas tal como lo indican las normas regulatorias de nuestro país.

1.5.1.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria móvil, Gram negativa en forma de bastón, está presente en todas las heces de mamíferos a grandes concentraciones. La gran mayoría de las cepas de *E. coli* residen como comensales inofensivos en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, sin embargo, algunas cepas son responsables de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

Escherichia coli se considera principalmente como un organismo índice ya que indica la posible presencia de patógenos ecológicamente similares ya que este organismo está siempre presente en las heces (Batt y Tortorello, 2014, p. 659-666). Este microorganismo ingresa a la leche pasteurizada y otros productos terminados como un contaminante posterior a la pasteurización. Comúnmente se ha utilizado como un indicador de contaminación fecal y como un indicador de higiene y seguridad alimentaria. La prueba de *E. coli* se realiza en productos, como verduras crudas, leche cruda, quesos y mariscos (Oyarzabal y Backert, 2012, pp. 127-145).

1.5.1.6 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un microorganismo cocoide Gram positivo, catalasa positiva. Es el agente causante de enfermedades transmitidas por alimentos causando intoxicación alimentaria “estafilocócica”. La presencia de *Staphylococcus aureus* o sus enterotoxinas en los alimentos procesados es generalmente una indicación de saneamiento deficiente por contaminación de procesamiento, que generalmente se debe al contacto humano o a superficies de contacto con alimentos contaminados (FDA, 2001)

La presencia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos generalmente indica contaminación de los productos procesados después del proceso de pasteurización. Constituyen fuentes de contaminación la transmisión humana por la piel, boca o nariz de los trabajadores en el área de procesamiento, la limpieza o desinfección inadecuada de los equipos, o la materia prima contaminada (Britz y Robinson 2008). La presencia de un gran número de microorganismos en un alimento puede indicar una mala manipulación o desinfección; sin embargo, no es evidencia suficiente para incriminar a un alimentos como la causa de la intoxicación alimentaria (FDA, 2001).

1.5.2 *Microorganismos causantes de deterioro*

La presencia de microorganismos indeseables en el queso puede producir defectos en la apariencia, sabor, y textura. Dichos microorganismos se encuentran en el queso debido a múltiples factores como el uso de leche cruda con baja calidad microbiana o por contaminación durante el proceso de fabricación, manipulación, o empaque. La inactivación de estos microorganismos patógenos resalta la importancia de la utilización de leche pasteurizada en la elaboración de quesos y la importancia de adherirse a estrictamente a las buenas prácticas de fabricación. los microorganismos que causan

defectos en los quesos incluyen algunas bacterias ácido lácticas (BAL), coliformes, psicrófilos, bacterias formadoras de esporas, corineformes, levaduras y mohos (Batt y Tortorello 2014, p. 446-482).

1.5.2.1 Defectos causados por BAL

Las BAL pueden causar efectos indeseables cuando determinadas especies proliferan dando lugar a efectos indeseables. Por ejemplo, el predominio de BAL heterofermentativas (por ejemplo, *Lb. brevis* y *Lb. casei* ssp. *pseudopantarum*) en queso de textura cerrada, como el Cheddar, da como resultado una "textura abierta" debido a la producción de gas. El defecto de cuerpo suave en el queso mozzarella se ha atribuido a la actividad proteolítica de lactobacilos mesófilos (por ejemplo, *Lb. casei* ssp. *casei*). El metabolismo de algunas bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB) como los enterococos también puede dar como resultado la formación de aminas biógenas en el queso, lo que perjudica la calidad del queso (Donnelly, 2016, p. 517-519).

1.5.2.2 Defectos causados por microorganismos psicrófilos

Los microorganismos psicrófilos son aquellos que crecen a temperaturas de $<7^{\circ}\text{C}$ (Donnelly 2014). Los microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Acinetobacter* son los responsables de la mayoría de los defectos causados en los quesos blandos frescos. Los defectos más comunes son la decoloración de la superficie, olores y sabores desagradables. Además, las enzimas lipolíticas termoestables producidas por estas bacterias en la leche cruda sobreviven a la fabricación causando rancidez. De manera similar las proteasas termoestables pueden causar proteólisis que produce amargor en el queso (Batt y Tortorello, 2014, p. 446-482).

1.5.2.3 Defectos causados por las bacterias coliformes

La presencia de coliformes en el queso es una indicación de saneamiento deficiente ya que estas bacterias son eliminadas en el proceso de pasteurización. Los coliformes producen H_2 y CO_2 que provocan el efecto de soplado tardío en el empaque del queso (Batt y Tortorello 2014, p. 446-482).

1.5.2.4 Defectos causados por bacterias formadoras de esporas

Las bacterias formadoras de esporas en los quesos pertenecen al género *Clostridium*. La principal fuente de contaminación de la leche por clostridios es el ensilaje. Las esporas sobreviven al proceso

de pasteurización y germinan en el queso, causando el desarrollo tardío de gas y sabor desagradable en muchas variedades de queso (Batt y Tortorello 2014, p. 446-482).

1.5.2.5 Defectos causados por las bacterias corineformes, levaduras y mohos

La presencia de un gran número de bacterias corineformes y levaduras en superficies de queso dan como resultado una corteza viscosa, de apariencia decolorada y sabores indeseables. El crecimiento de mohos es también un problema común por la decoloración, aspecto pobre y sabores desagradables. Además, algunos mohos producen micotoxinas que afectan la salud de los consumidores. El empaque hermético puede evitar su crecimiento indeseable (Batt y Tortorello 2014, p. 446-482).

1.5.3 Microorganismos beneficiosos

La microbiota de queso se divide en dos grupos básicos, la flora inicial y la flora secundaria. La flora inicial, formada de bacterias ácido lácticas (BAL), puede ser añadida al comienzo de la fabricación o puede estar presente de forma natural en la leche. Es la responsable del desarrollo del ácido durante la producción del queso. Mientras que la flora secundaria está compuesta de bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB), mohos, levaduras y otros grupos bacterianos que pueden crecer externa o internamente en la mayoría de las variedades de quesos. Ambos grupos contribuyen básicamente a la formación del aroma/sabor deseado y las características de textura en el queso (Ozer y Akdemir-Evrendilek, 2015; Fuquay, et al., 2011).

1.5.3.1 Bacterias ácido lácticas

Las BAL comprenden un grupo grande y heterogéneo de microorganismos asociados a dos phylum distintos *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Dentro del primero BAL pertenecen al orden *Lactobacillales* que incluye los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Dentro del phylum *Actinobacteria*, el género *Bifidobacterium* es el más importante (Klaenhammer et al., 2005; Pfeiler y Klaenhammer, 2007; Bergey, 2009).

Las bacterias ácido lácticas se caracterizan principalmente por ser Gram positivas, catalasa negativa, anaerobias facultativas, no esporulantes, no móviles y ácido tolerantes (Klaenhammer et al., 2005; Donnelly 2014; Vasiee, et al., 2017; Batt y Tortorello 2014). Este grupo bacteriano se caracteriza por su capacidad metabólica de fermentar azúcares en ácido láctico principalmente. Su heterogeneidad se refleja bien

en su amplio rango de morfologías celulares pudiendo presentarse en forma de cocos, cocobacilos, bacilos, en células individuales, parejas, tétradas, cadenas cortas o largas (Ozer y Akdemir-Evrendilek, 2015; Holzapfel y Wood, 2014; Fuquay, et al., 2011). Se los describe como microorganismos microaerófilos, caracterizados por una mayor tolerancia a un pH bajo lo que les permite superar a otras bacterias en una fermentación natural, ya que pueden resistir la acidez incrementada por la producción de ácido orgánico (Holzapfel y Wood, 2014, pp.13-51).

El hábitat natural de las BAL está representado por entornos nutricionalmente ricos. Las BAL se pueden encontrar en materias primas vegetales y animales, y sus productos fermentados correspondientes, incluidos los entornos de plantas lácteas, cárnicas, vegetales y cereales, donde puede producirse la fermentación. Algunas especies también se encuentran en los tractos respiratorio, intestinal y genital de humanos y animales. La capacidad de colonizar una variedad de hábitats es una consecuencia directa de la amplia versatilidad metabólica de este grupo de bacterias (Holzapfel y Wood, 2014, 13-51).

1.5.3.2 Tipos de fermentación

La diversa capacidad metabólica que poseen las bacterias ácido lácticas hace que sean muy adaptables a una variedad de condiciones y es en gran parte responsable de su éxito en la fermentación ácida de los alimentos. Las BAL se pueden dividir en tres grupos en función de las características de fermentación como (Holzapfel, W; Wood 2014, pp.13-51):

- Homofermentativa obligada
- Heterofermentativa facultativa
- Heterofermentativa obligada

Las BAL homofermentativas obligadas producen esencialmente ácido láctico mientras que las BAL heterofermentativas obligadas y facultativas producen una variedad de productos finales de fermentación incluidos ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, etanol y dióxido de carbono (Pfeiler y Klaenhammer, 2007; Donnelly, 2014).

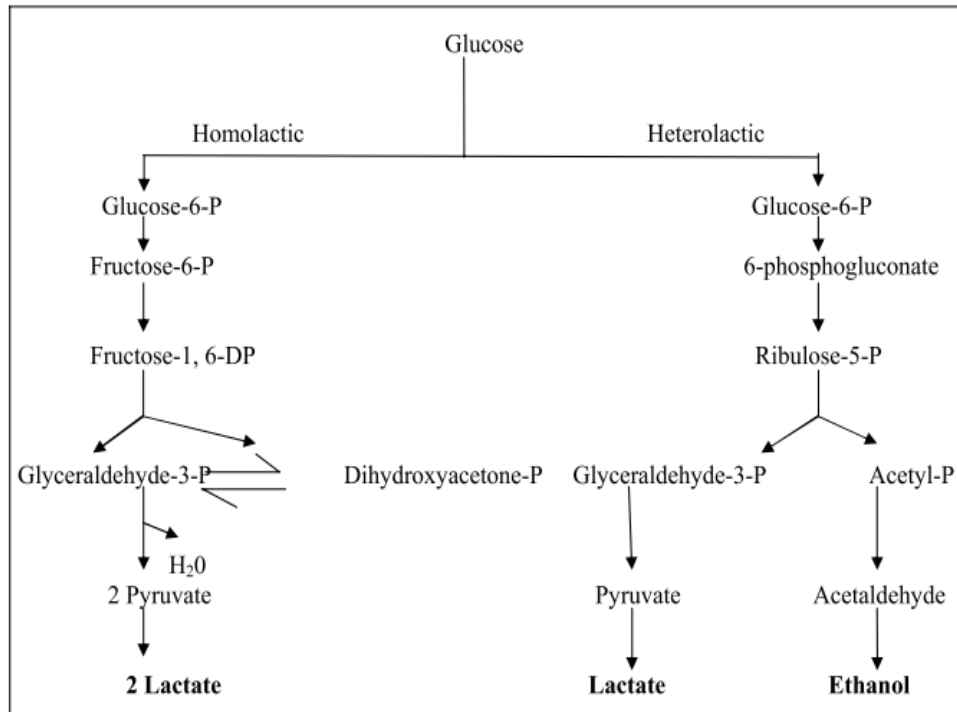


Figura 1-1: Esquema general de la fermentación de glucosa por las BAL

Fuente: (Caplice y Fitzgerald, 1999)

1.5.3.3 Bacterias ácido lácticas iniciadoras

Conocidos como cultivos primarios o bacterias iniciadoras (“*starters*”), son microorganismos utilizados en la fabricación de alimentos fermentados como los quesos. Su principal función es fermentar azúcares en ácido láctico, lo que reduce el pH de la leche, iniciando la transformación de leche en queso (Donnelly, 2016; Fox et al., 2017).

En el queso Mozzarella, la función principal de los cultivos iniciadores es asegurar la acidificación rápida de la cuajada durante el estiramiento en agua caliente. La cantidad y variedad de microorganismos en el iniciador dependen del proceso tecnológico y, en particular, del uso de iniciadores de suero naturales (Suzzi et al., 2001, p. 117).

- **Iniciadores primarios**

Su principal función es la producción de ácido láctico a partir de lactosa. Los iniciadores primarios generalmente se clasifican como mesófilos o termófilos. Los iniciadores mesófilos son usados en

todas las variedades de queso que no excedan ~ 40°C, durante las primeras etapas de producción de ácido. Por su parte los iniciadores termófilos son característicos de ciertas variedades de queso como el mozzarella, donde prevalece una temperatura alta durante las primeras fases de la fabricación (McSweeney, et al., 2017, pp. 251-278).

Los cultivos mesófilos comprenden principalmente cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *Lactis*, *Leuconostoc* sp. Los cultivos termófilos comprenden *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* o *Lb. helveticus* (Fox et al., 2017, pp. 9-87).

- **Iniciadores secundarios**

Llamados también cultivos adjuntos, son utilizados para mejorar las propiedades sensoriales del queso como el sabor, aroma, textura, o por sus beneficios para la salud (probióticos) (McSweeney, et al., 2017). Todos los cultivos iniciadores disponibles en la actualidad se derivan de una forma u otra de *iniciadores naturales* (o artesanales), de composición indefinida, es decir, que contiene una mezcla indefinida de diferentes cepas y/o especies (Donnelly, 2014, pp. 40-73).

1.5.3.4 Bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB)

Las bacterias ácido lácticas que forman parte de la flora secundaria, que no se usan como iniciadores, pero que son bacterias espontaneas comúnmente encontradas en el queso se denominan NSLAB. El impacto de NSLAB en las propiedades del queso depende de su nivel de población, tipo de queso, y de las especies presentes. Por lo tanto, pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de características organolépticas y bioquímicas deseables, así como indeseables, por ejemplo, algunas NSLAB heterofermentativas producen CO₂ que provoca la formación de agujeros, característica deseable en los quesos Emmental pero no así en el Provolone. Son encontradas en altas cantidades en la mayoría de los quesos maduros, incluyendo algunos quesos fabricados a partir de leche pasteurizada (Donnelly, 2014 ; McSweeney, et al., 2017).

NSLAB podrían provenir de la leche, especialmente cuando se usa leche cruda, pero también del medio ambiente de las plantas procesadoras de productos lácteos. Este tipo de bacterias son en consecuencia contaminantes naturales del queso. Es difícil eliminarlas mediante medidas higiénicas ya que algunas cepas NSLAB pueden sobrevivir al proceso de pasteurización, mientras otras

sobreviven en la planta de procesamiento y contaminan la leche después de la pasteurización (Donnelly, 2014, pp. 40-73)

Las principales especies de NSLAB son lactobacilos mesófilos facultativamente heterofermentativos, miembros del grupo de *Lactobacillus casei* o *lactobacillus paracasei* y *lactobacillus rhamnosus*. Sin embargo, se han descrito muchas otras especies de NSLAB en el queso, incluidas otras especies facultativamente heterofermentativas de lactobacilos (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. curvatus*, etc.), algunas especies obligadamente heterofermentativas de lactobacilos (*L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. brevis*, etc.), y especies de pediococos y enterococos. Varias especies de NSLAB se aíslan de los quesos, se cultivan en forma pura para ser usadas comercialmente como facilitadores de la maduración y como probióticos (Donnelly, 2014, p. 40-73). Como se observa en la figura 2-1, los cultivos BAL iniciadores, generalmente crecen a una población de mil millones de células por gramo de queso durante las primeras etapas de la fabricación del queso, luego su población viable disminuye, contrariamente a lo que sucede con los NSLAB que al inicio de la producción se encuentra en pequeñas cantidades y aumentan en las etapas finales (Donnelly 2016).

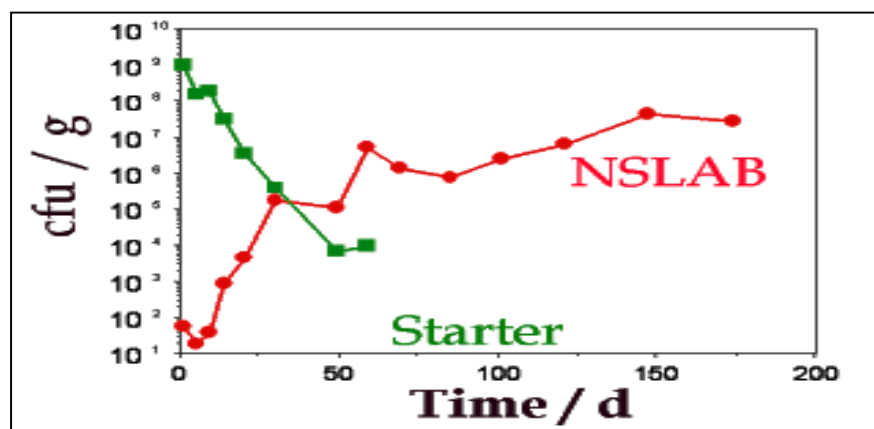


Figura 2-1: Cinética de crecimiento de NSLAB y los "starters" o iniciadores

Fuente: (Cheese Science, 2015)

1.5.4 Principales géneros de BAL

La clasificación de las bacterias del ácido láctico en diferentes géneros se basa principalmente en la morfología, el modo de fermentación de la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia ácida o alcalina.

Tabla 2-1: Géneros comunes de BAL y sus características diferenciales

Familia	Género	Forma	Características						
			CO ₂ de la glucosa	Crecimiento a 10° C	Crecimiento a 45° C	Crecimiento en 6.5% de NaCl	Crecimiento en 18% de NaCl	Crecimiento a pH 4.4	Crecimiento a pH 9.6
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	+	-	+	-	-	+
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacilos	-	+	-	ND	-	ND	-
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Cocos	-	+	+	+	-	+	+
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocos (tétradas)		+	-	+	+	variable	+
	<i>Vagococcus</i>	Cocos		+	-	-	-		-
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	variable	variable	variable	variable	-	variable	-
	<i>Pediococcus</i>	Cocos (tétradas)	-	variable	variable	variable	-	+	-
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Cocos ^a	+	+	-	variable	-	variable	-
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	variable	-	variable	-
	<i>Weissella</i>		+	+	-	variable	-	variable	-
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Cocos	-	+	-	-	-	variable	-
	<i>Streptococcus</i>		-	-	Variable	-	-	-	-

Notas: ND, no determinado. Algunas cepas de *Weissella* tienen forma bacilar.^b En la literatura antigua los lactococos se conocían como *Streptococcus* del grupo N.

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Fuente: (Lahtinem, et al., 2012, p. 3).

1.5.4.1 *Lactobacillus spp.*

Los miembros del género *Lactobacillus* se presentan en forma de bacilo, aunque también se pueden observar cocobacilos; las células a menudo están organizadas en forma de cadenas. En general toleran el oxígeno, pero crecen bien en condiciones anaeróbicas, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 y 40°C, aunque la temperatura de crecimiento general puede oscilar entre 2 y 53°C. El rango de pH para el crecimiento está entre 3 y 8 (Holzapfel y Wood 2014).

Lactobacillus es el género más grande dentro del grupo de las BAL. En el queso tienen múltiples efectos dependiendo de la especie, la cepa, las condiciones de fabricación y del producto. Los dos papeles beneficiosos más obvios de los lactobacilos son como cultivos iniciadores y como cultivos probióticos. Sin embargo, también pueden sintetizar bacteriocinas y exopolisacáridos y contribuir al sabor de diferentes productos lácteos; en determinadas circunstancias, también pueden causar defectos de sabor y textura (Fuquay, et al., 2011).

1.5.4.2 *Lactococcus spp.*

Los lactococos son bacterias facultativamente anaeróbicas y mesófilas. Las colonias son pequeñas, translúcidas o blanquecinas, circulares, lisas y enteras dentro de 1-2 días de incubación en medios enriquecidos complejos. En términos de morfología celular los lactococos son células esféricas u ovoides, que se presentan individualmente, en cadenas o como grupos irregulares. Pueden crecer a 10°C pero no a 45°C (Fuquay, et al., 2011). Son moderadamente halófilos y generalmente crecen en NaCl al 4% a 20-30 °C durante 10-20 h, excepto para *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (óptimo: 2% de NaCl). Los lactococos crecen bien a valores de pH casi neutro, pero dejan de crecer a un pH de 4,5 aproximadamente.

El uso industrial más antiguo de *Lactococcus* es como cultivo iniciador de productos lácteos fermentados como queso. Sus principales funciones en la fermentación láctea incluyen el desarrollo de textura mediante la producción de exopolisacáridos y de sabor mediante la producción de compuestos aromáticos. También pueden usarse para la conservación de alimentos debido a su capacidad para producir ácidos orgánicos y bacteriocinas, con la nisina como el conservante mejor caracterizado y reconocido entre ellos. Las especies de *Lactococcus* también se han usado como probióticos (Holzapfel y Wood, 2014, pp.40-63)

1.5.4.3 *Streptococcus spp.*

Son células esféricas u ovoides, se presentan formando pares o cadenas, crecen en condiciones aeróbicas facultativas, algunas requieren CO₂ adicional para el crecimiento. Los estreptococos son homofermentativos y, por lo tanto, no producen CO₂ a partir de la glucosa. La temperatura óptima de crecimiento es generalmente de alrededor de 37 °C, pero las temperaturas mínima y máxima de crecimiento pueden variar entre las especies. Exhiben reacciones variables para el crecimiento en caldo que contiene NaCl al 6.5%. Utilizando pruebas fenotípicas, el género *Streptococcus* es especialmente difícil de distinguir de los géneros *Enterococcus* y *Lactococcus*, por lo que la identificación del género debe completarse con métodos de identificación molecular (Holzapfel y Wood, 2014, pp. 95-123).

La especie representativa de este género a nivel industrial es *Streptococcus thermophilus*, que es usado como cultivo iniciador, además produce exopolisacáridos y compuestos que contribuyen al sabor. Se ha demostrado que *Streptococcus thermophilus* produce bacteriocinas (termofilinas), que son activas contra ciertos microbios de deterioro de lácteos (Holzapfel y Wood, 2014, pp. 95-123).

1.5.4.4 *Enterococcus spp.*

El género *Enterococcus* ha sido considerado el más controvertido de las BAL (Moreno et al., 2006). A diferencia de la mayoría de las BAL, el género *Enterococcus* no se considera como “GRAS”. La evaluación de la seguridad de los enterococos sigue siendo debatida. Aunque algunos enterococos se consideran útiles en la tecnología del queso y se usan como probióticos, otros causan enfermedades nosocomiales. Bajo el microscopio, aparecen como células individuales o formando pares o cadenas. Habitualmente crecen a 10° C y 45° C, en NaCl al 6.5% y a pH de 9.6, y sobreviven al calentamiento a 60°C durante 30 min (Fuquay, et al., 2011, pp. 534 -745).

Los enterococos a menudo se identifican como constituyentes de la microbiota autóctona de los quesos artesanales de leche cruda y se cree que contribuyen a las cualidades organolépticas únicas de estos productos. Los enterococos son encontrados en altos números ($>10^7$ g⁻¹) en algunos quesos artesanales. El crecimiento de estos organismos en algunas variedades se considera deseable y puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del aroma en algunos quesos como los del tipo mozzarella (Fuquay, et al., pp. 534-745). Un beneficio adicional de los enterococos en el queso es que muchas cepas producen bacteriocinas que pueden ayudar a controlar patógenos como *Listeria monocytogenes* (Donnelly, 2014, p. 40-73).

1.5.5 Beneficios de las BAL

Son uno de los grupos de bacterias más importantes desde el punto de vista industrial, se puede decir que solo son superadas por las levaduras en servicio a la humanidad. Su uso reconocido como (GRAS), las hace útiles en múltiples aplicaciones industriales como cultivos iniciadores, ya que producen ácido láctico lo que provoca entre otros efectos una disminución del pH, evitando así la proliferación de ciertas bacterias patógenas. Por otro lado algunas cepas son bacterias promotoras de la salud por uso como probióticos (Lahtinem, et al., 2012, p. 7-17).

Numerosos estudios han demostrado que estos microorganismos autóctonos mejoran las propiedades tecnológicas y sensoriales de los sistemas alimentarios, y que también pueden contribuir en la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y deteriorantes (Poltronieri, 2018, pp. 161-172). Las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de producir componentes inhibitorios como el ácido láctico, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrogeno, y bacteriocinas, pequeños péptidos con capacidad antimicrobiana (Bacha, et al., 2010, pp. 213-223).

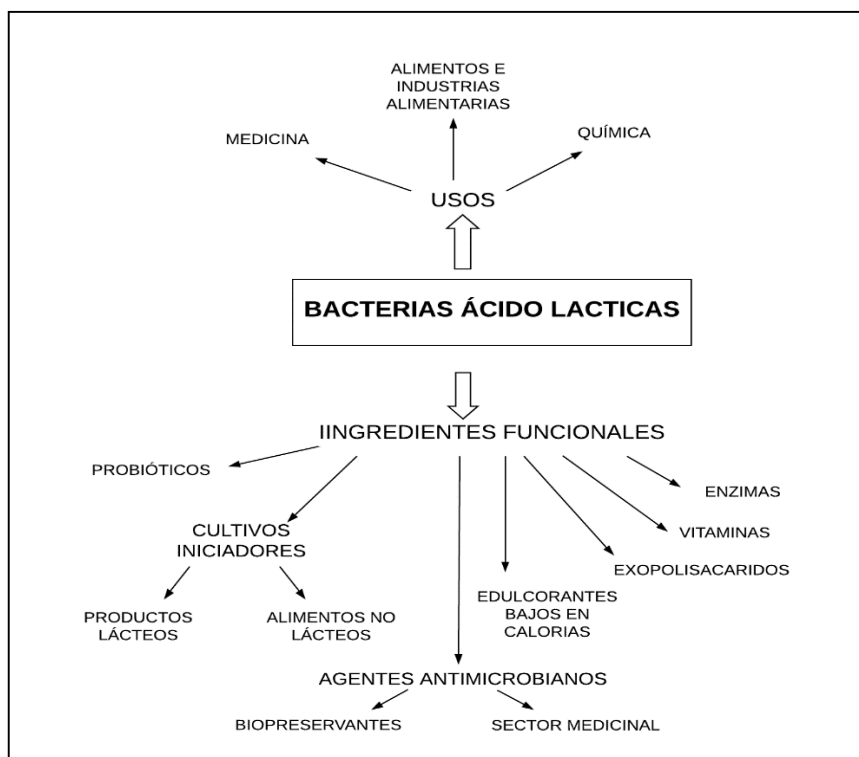


Figura 3-1: Usos e ingredientes funcionales de las bacterias ácido lácticas.

Fuente: (Florou-Paneri, et al., 2013)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de la investigación

La presente investigación fue llevada a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y en el Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos, de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia.

2.2 Factores de estudio

2.2.1 Población

Los quesos de hoja son elaborados de forma tradicional en la ciudad de Latacunga, provincia de Cotopaxi. No se cuenta con un registro de productores artesanales, pero el producto es comercializado en diferentes lugares de la ciudad de Latacunga, que puede ser fácilmente reconocido por su envoltura en hojas de achira. Mientras que el queso de hoja producido a nivel industrial es elaborado por un único productor certificado por el ARCSA, dentro de la misma ciudad, cuyos productos son comercializados en diversas ciudades del Ecuador.

2.2.2 Muestra

Las muestras fueron recolectadas en tres periodos aleatorios. Los quesos de hoja artesanales fueron adquiridos en tres lugares de expedición (QHA1, QHA2, QHA3), siendo analizados por duplicado en cada muestreo. El queso de hoja industrial fue adquirido directamente del productor en sus dos presentaciones, y cada uno fue analizado por triplicado en cada muestreo (QHI1, QHI2).

2.3 Materiales, equipos y reactivos

A continuación, se indican los materiales, equipos y reactivos utilizados durante la evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja.

Tabla 1-2: Materiales, equipos, reactivos usados en los análisis microbiológicos

Materiales	Aguja de inoculación	Pipetas Pasteur
	Asa de inoculación	Pipetas volumétricas de 10 mL
	Balón de aforo de 25 mL	Piseta
	Bloques de hielo reutilizable	Placas Petri
	Caja térmica de poliestireno 15 L	Placas porta y cubreobjetos
	Dispersor para placas Petrifilm	Probeta de 25, 100 mL
	Espátula	Puntas para micropipeta 100 ul
	Fundas estériles	Termómetro
	Gradillas	Toallas de papel blanco
	Lámpara de alcohol	Tubos Durham
	Matraz de Erlenmeyer de 250, 500 mL	Tubos de ensayo estériles
	Micropipeta de 500, 1000 ul	Tubos Falcón
	Papel aluminio	Tubos Eppendorf 1,5 mL
	Pipeta graduada 1, 10 mL	Vasos de precipitación 100, 250 mL
Equipos	Autoclave	Incubadora Bacteriológica
	Agitador Magnético	Microscopio
	Balanza Analítica	pH-metro
	Cámara de Flujo Laminar	Refrigerador
	Cronómetro	Reverbero
Reactivos	Ácido acético 5M	Glucosa
	Alcohol-cetona	Peróxido de hidrogeno al 30%
	Agua destilada	Lugol
	Aceite de inmersión	Cloruro de sodio (NaCl)
	Alcohol potable	Hidróxido de sodio 2N (NaOH)
	Cristal violeta	Peptona
	Extracto de carne	Rojo Fenol
	Glicerol al 30%	Tiras de oxidasa

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Tabla 2-2: Medios de Cultivo

Agar estándar métodos	Caldo rojo fenol
Agua peptonada	Discos de confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i>
Agar MRS	Medio Sim
Agar M17	Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>
Caldo MRS	Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de <i>E. coli</i> /Coliformes

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

2.4 Técnicas y métodos

2.4.1 Toma y transporte de muestras

Las muestras fueron recolectadas de acuerdo a su origen de producción, para ser transportadas hasta el lugar de análisis de acuerdo a la Norma NTE INEN 1529-2: control microbiológico de los alimentos: toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

2.4.2 Muestreo de queso de hoja artesanal

Se recolectaron las muestras de queso de hoja elaborado de forma artesanal de tres lugares diferentes de comercialización, como se indica en la tabla 3-2.

Tabla 3-2: Lugares de muestreo QHA

Lugar de origen	Código muestra
Punto de venta 1	QHA1
Punto de venta 2	QHA2
Punto de venta 3	QHA3

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

2.4.3 Muestreo de queso de hoja industrial

Se recolectaron las muestras de queso de hoja elaborado a nivel industrial en sus dos presentaciones del único productor registrado en el ARCSA.

Tabla 4-2: Productos "Queso de hoja Industrial"

Producto	Código Muestra	Presentación	Contenido neto (g)
Queso de hoja industrial 1	QHI1	Forma redonda	450
Queso de hoja industrial 2	QHI2	Forma rectangular	80

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

2.5 Análisis microbiológicos

2.5.1 Preparación de diluciones

El procedimiento de preparación de las diluciones de las muestras de queso fue realizado de acuerdo a la norma NTE INEN 1529:2, la cual establece: pesar 10g de la muestra de queso y colocar en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 90 mL de agua peptonada previamente esterilizada, agitar el envase hasta su homogenización, dilución 1:10. Transferir 1 mL de la dilución anterior a un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada, obteniendo de esta manera la dilución 1:100. Realizar el mismo procedimiento hasta obtener la dilución 1:1.000.000.000. Se trabajaron con diferentes diluciones de acuerdo al ensayo a realizar y el tipo de queso de hoja ya sea industrial o artesanal (INEN 1529-2 2013).

2.5.2 Control de calidad

Para el análisis microbiológico de control de calidad fueron analizados: aerobios mesófilos, coliformes, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

2.5.2.1 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1529-5.

Procedimiento

Identificar las placas Petri y colocar 1 mL de la dilución requerida en el centro de la placa. Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 15 mL de agar estándar métodos, fundido y templado a $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio

de cultivo. Dejar reposar las placas hasta que solidifique el agar. Invertir las placas e incubarlas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 48 a 75 h (INEN 1529-5:2006).

Expresión de resultados

Después de la incubación, se cuentan las colonias visibles en aquellas placas que contienen más de 15 colonias y menos de 300, luego el resultado se calcula en base al recuento y el factor de dilución, expresar los resultados en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g).

2.5.2.2 Recuento de bacterias coliformes, Escherichia coli y Staphylococcus aureus.

Se utilizaron los métodos oficiales para el recuento mediante la técnica de Petrifilm, AOAC 991.14 para *Escherichia coli*/coliformes y AOAC 2003.07 para *Staphylococcus aureus*.

Procedimiento

Rotular el código de la muestra en la placa Petrifilm y colocarla en una superficie plana. Levantar el film superior y con una micropipeta colocada de forma perpendicular a la placa Petrifilm, colocar 1 mL de la muestra en el centro del film inferior. Bajar el film superior con cuidado evitando la formación de burbujas de aire. Con la cara lisa hacia abajo, ejercer suavemente presión con el aplicador para distribuir el inóculo sobre la superficie circular antes de la formación del gel. Levantar el difusor y esperar 1 minuto hasta que solidifique el gel. Incubar las placas cara arriba a la temperatura y tiempo específico de cada microorganismo como se indica en la tabla 5-2 (3M, 2017) .

Tabla 5-2: Condiciones de crecimiento microbiano en placas Petrifilm

Microorganismo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
Coliformes	$35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	$24\text{h} \pm 2\text{h}$
<i>Escherichia coli</i>	$35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	$48\text{h} \pm 2\text{h}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	$24\text{h} \pm 2\text{h}$

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Expresión de resultados

Realizar el recuento bacteriano de acuerdo a la guía de interpretación de cada microorganismo, que se resume en la tabla 6-2. Realizar los cálculos necesarios y emitir los resultados en Unidades Formadores de colonias (UFC/g).

Tabla 6-2: Características de identificación en placas Petrifilm

Microrganismo	Características de crecimiento microbiano
Coliformes totales	Colonias rojas y azules con gas
<i>Escherichia coli</i>	Colonias azules con gas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonias rojo violeta

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

2.5.2.3 Disco de confirmación 3M para *Staphylococcus aureus*.

Si aparecen colonias de color diferente al rojo violeta, características de *Staphylococcus aureus*, se debe emplear el disco de confirmación Petrifilm.

Procedimiento

Retirar un disco de confirmación de su envase agarrándolo por la lengüeta. Levantar el film superior de la placa Petrifilm y colocar el disco en la parte central de placa. Bajar el film superior. Presionar suavemente la zona que ocupa el disco incluidos los bordes del mismo, con el objetivo de obtener un buen contacto entre el disco y la placa. Volver a incubar la placa a la temperatura especificada para *Staphylococcus aureus* por 3h. Contar como *Staphylococcus aureus* todas las zonas rosas haya o no colonia (3M, 2017)

2.5.3 Recuento de bacterias ácido lácticas

Se tomó como referencia la Norma PRT-712.02-047 del Instituto de Salud Pública de Chile, y la Norma ISO 16068, para el recuento de BAL por el método de vertido en placa. Se realizaron los recuentos en los medios de cultivo MRS y M17.

Preparación de los medios de cultivo

MRS: el agar de Man Rogosa Shape de la marca Oxoid, establece la disolución de 62g en 1L de agua destilada, y la esterilización a 121° C por 15 minutos en el autoclave. El medio posee un pH final de 6.2 aproximadamente luego de su preparación. Con el objetivo de lograr mayor selectividad se ajustó el pH a 5.4 del medio con ácido acético 5M, antes de su esterilización.

M17: el agar de la marca Conda establece que para su preparación se suspenden 55g en 1L de agua destilada. Las condiciones de esterilización son de 121°C por 15 minutos en el autoclave. El pH del medio es de 7.2 ± 0.2 , no necesita ser modificado ya que el medio es selectivo para el cultivo y enumeración de cocos lácticos en leche y productos lácteos.

Procedimiento

Se preparan diluciones seriadas de las muestras para ser sembradas en medios de cultivo selectivos. Depositar 1000 uL de la dilución requerida en placas petri estériles e inmediatamente verter aproximadamente 15mL de agar MRS. Mezclar el inóculo con el agar y dejar reposar hasta que solidifique. Incubar las placas a 37°C por 72 h en condiciones aeróbicas (Instituto de Salud Pública de Chile 2010). Se procede de manera similar para el recuento de BAL en agar M17, con la diferencia de que las placas se incuban a 32°C por 48h en condiciones microaerofílicas utilizando el sistema de jarras Gas- Pack.

2.5.4 Aislamiento de BAL

Con el objetivo de aislar cocos y bacilos pertenecientes a BAL, colonias individuales fueron tomadas de las cajas de agar MRS y M17 de acuerdo a sus características macroscópicas.

2.5.4.1 Aislamiento de bacilos

Seleccionar las colonias con características macroscópicas pertenecientes a las BAL de las placas que fueron utilizadas para el recuento en agar MRS. Tomar cada colonia con el asa de inoculación y sembrar en 5 mL de caldo MRS esterilizado. Incubar a 37°C por 24h. Luego del periodo de incubación, tomar una muestra con el asa y sembrar por el método de agotamiento por estría en agar MRS, pH 5.4. Incubar las placas en posición invertida a 37°C por 72h en condiciones aeróbicas.

Repetir el mismo procedimiento por un total de 3 veces con cada cepa con el objetivo purificarlas. Para asegurarnos de la conservación de la cepa en cada pase sucesivo de caldo a agar, se realizan las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y tinción Gram.

2.5.4.2 Aislamiento de cocos

Con el asa de inoculación tomar las colonias con características macroscópicas pertenecientes a las bacterias ácido lácticas de las placas de agar M17 utilizadas en los recuentos. Seguir el mismo procedimiento del aislamiento de bacilos, incubando las placas en posición invertida a 32°C en condiciones de microaerofilia por 48 h.

2.5.5 Pruebas bioquímicas para el aislamiento

2.5.5.1 Tinción de Gram

Depositar sobre un portaobjetos una gota de agua destilada, luego tomar con un asa de siembra una parte de la colonia de la muestra a analizar, mezclar y fijar a la flama. Cubrir con la solución de cristal de violeta durante 1 min, desechar el colorante y lavar ligeramente al chorro de agua, después añadir la solución de yodo durante 1 min, desechar y lavar al chorro de agua. Con el portaobjetos inclinado, agregar gota a gota la solución de alcohol-cetona y lavar al chorro de agua. Finalmente cubrir con safranina de 10 a 20 segundos, desechar el colorante y lavar con agua (Fernández Olmos et al., 2010, PP. 25-40).

2.5.5.2 Prueba de catalasa

Tomar con un asa de inoculación el centro de una colonia obtenida de un cultivo puro de 10 a 24 horas y colocar sobre un portaobjetos, agregar una gota de peróxido de hidrogeno al 30% sobre el cultivo y observar la inmediata formación de burbujas que indica la liberación de gas, determinando la prueba como positiva. Se incluye un testigo negativo (Fernández Olmos et al., 2010, pp. 25-45).

2.5.5.3 Prueba de oxidasa

Tomar una colonia con el asa de inoculación y depositarla sobre una tira de oxidasa. La cepa es catalasa positiva cuando hay un viraje del color blanco de la tira a morado, caso contrario se reporta como catalasa negativa (Fernández Olmos et al., 2010, pp. 25-45).

2.5.6 Pruebas de caracterización

Todas las cepas aisladas fueron sometidas a diferentes pruebas fenotípicas para la posible identificación de los géneros.

2.5.6.1 Prueba de movilidad

Se observa la movilidad las cepas en el medio semisólido Sim.

Procedimiento.

Con el aguja de inoculación se toma una cepa fresca de un medio de cultivo sólido. Sembrar en línea recta por punción profunda en medio Sim, tratando de abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h, en aerobiosis.

Las cepas móviles producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra, mientras que en las cepas inmóviles el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.

2.5.6.2 Producción de CO_2 a partir de glucosa

Se formuló caldo rojo fenol que sirve de base para evidenciar la fermentación del carbohidrato glucosa, ya que posee el indicador, rojo fenol.

Formulación de caldo rojo fenol

El caldo base fue formulado para lograr la fermentación de un carbohidrato individual, en este caso de la glucosa. Los ingredientes se detallan en la tabla 7-2. El caldo rojo fenol posee un color naranja-rojizo y un pH final de 7.4, que se ajustó con NaOH 2N.

Tabla 7-2: Ingredientes de caldo rojo fenol

Ingrediente	Cantidad
Peptona	12g
Extracto de carne	1g
NaCl	5g
Rojo Fenol	0.018g
Glucosa	10g
Agua destilada	1000 mL

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Procedimiento

Colocar 10 mL del caldo rojo fenol en un tubo de ensayo estéril que contiene en su interior un tubo Durham con la abertura hacia abajo. Autoclavar los tubos de ensayo a 121 °C por 15 minutos, sin exceder éste tiempo ya que el carbohidrato puede sufrir la reacción de Maillard. Con el asa de inoculación tomar una cepa aislada e inocularla en el caldo. Incubar a 32°C los tubos con los aislados de M17 y a 37° los aislados de MRS, por 48h. Si hay fermentación del carbohidrato el medio se tornará amarillo y si hay producción de gas durante la incubación de los cultivos, éste se manifiesta por la presencia de burbujas en el interior de los tubos Durham, reportando así la prueba como positiva.

2.5.6.3 Crecimiento a diferentes temperaturas

El desarrollo a diferentes temperaturas se identificó inoculando las cepas en tubos de ensayo que contenían 5mL de caldo MRS. Una vez inoculados los tubos, se procedió a su incubación a 10 y 45°C respectivamente, durante 24h. La prueba de crecimiento a diferentes temperaturas se reporta como positiva cuando se observa crecimiento del aislado por turbidez del caldo.

2.5.6.4 Tolerancia al cloruro sódico

La tolerancia al NaCl se identificó mediante la inoculación de los aislados en caldo MRS suplementado con 6.5 y 18% de NaCl. El medio, una vez inoculado, se incubó durante 48 horas a 32°C. La prueba es positiva cuando se observa crecimiento de la cepa.

2.5.6.5 Tolerancia a diferentes pH

El crecimiento de los aislados a pH de 4.4 y 9.6 se evaluó en caldo MRS. Para ajustar el pH a 4.4 se utilizó ácido acético 5 M mientras que para ajustar el pH a 9.6 se utilizó NaOH 2N. Se incubó durante 48h a 32 °C. La prueba es positiva cuando se observa crecimiento de la cepa.

2.5.7 Conservación de las cepas

Para el almacenamiento a largo plazo, los cultivos puros de BAL se conservaron en caldo MRS que contenían glicerol al 30% (v/v) a -20° C.

Procedimiento

Se realizó el cultivo overnight a 33°C en caldo MRS de las colonias bacterianas aisladas. Se mezclaron volúmenes iguales de cultivo overnight y de glicerol al 30%, previamente esterilizado a 121°C y 1 atm de presión. Luego de colocar las cepas BAL aisladas sobre el glicerol, se agita de manera constante para lograr una mezcla uniforme. Al final se distribuye 1mL la mezcla en tubos Eppendorf, para su conservación en un ultracongelador a -20°C.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Resultados del análisis microbiológico de los quesos de hoja artesanal e industrial

3.1.1 Recuentos de aerobios mesófilos

Los resultados que se presentan en la Tabla 1-3 corresponden a la evaluación de aerobios mesófilos de 5 quesos de hoja. La abreviatura QHA indica que fueron muestras de quesos de hoja elaborados de forma tradicional, mientras que QHI fueron elaborados industrialmente. Todas las muestras fueron recolectadas en 3 muestreos aleatorios y por duplicado, en los lugares de expendio en la ciudad de Latacunga, provincia de Cotopaxi.

Tabla 1-3: Resultados del recuento de aerobios mesófilos en queso de hoja

Aerobios mesófilos		
Muestras	Log X y DE	Log índices máximos permisibles
QHA1	9,18 ^a ± 0,04	N.E.
QHA2	8,59 ^a ± 0,10	N.E.
QHA3	9,35 ^a ± 0,08	N.E.
QHI1	7,81 ^b ± 0,06	N.E.
QHI2	7,36 ^b ± 0,03	N.E.
^a Los datos son los valores promedio de dos muestras del mismo origen ± desviación estándar. ^b Los datos son los valores promedio de tres muestras del mismo origen ± desviación estándar. N.E.= No encontrado.		

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Como se puede evidenciar, los quesos de hoja artesanales poseen un número mayor de aerobios mesófilos en comparación con los quesos de hoja industriales. La norma NTE INEN 1528 no establece como requisito microbiológico el análisis de estos microorganismos. No existen normas de referencia para el recuento de aerobios mesófilos en quesos frescos por ser indicadores generales de la población microbiana que varían de acuerdo al tipo de alimento, sin embargo, Acevedo et al., (2013, p. 43) determinaron 7,28 log UFC/g de estos microorganismos en queso fresco tipo mozzarella antes de aplicar las BPM al proceso artesanal de elaboración, ya que el crecimiento de estos

microorganismos aumenta cuando las condiciones de fabricación, manejo, almacenamiento no siguen normas correctas de higiene; el recuento se redujo a 2,46 log/UFC tras su aplicación. Con base en esto se puede indicar que los resultados obtenidos en este trabajo respecto a este tipo de carga microbiana son altos tanto para los quesos elaborados artesanal como industrialmente.

Los resultados antes expuestos son similares a los encontrados para el queso de hoja industrial, observándose recuentos mayores para los quesos de hoja artesanales. No se puede establecer si éstos corresponden a microbiota propia del queso o a contaminantes externos, sólo se puede señalar que los quesos artesanales poseen un recuento mayor en comparación con los quesos de hoja industriales.

El proceso de elaboración del queso de hoja tradicional influye directamente en el recuento de aerobios mesófilos, ya que de acuerdo con Marotta et al., (2017, p. 1) los productos artesanales como el queso de hoja se comercializan en los mercados como productos alimenticios sin envasar, en los cuales no se controlan parámetros de producción como el tiempo y temperatura de pasteurización. No obstante, a nivel industrial el envasado del producto al vacío, así como el mantenimiento de los puntos críticos de control como los asociados a la pasteurización, garantizan su efectividad dando como resultado productos de buena calidad microbiológica, lo que puede relacionarse con los resultados del recuento de aerobios mesófilos que son menores para los quesos de hoja industriales en contraste con los quesos de hoja artesanales.

El queso de hoja tradicional de acuerdo a su proceso de elaboración se puede asociar con los quesos de pasta hilada, de los cuales el mozzarella es su principal representante (Kindstedt et al., 2004, p. 251). Si bien, en el queso de hoja artesanal no se pueden controlar los parámetros de producción como la pasteurización, existe un fuerte tratamiento térmico, ya que el estiramiento de la cuajada se logra a una temperatura de $\sim 70^{\circ}\text{C}$. Se puede establecer que la prevalencia de microorganismos, como los aerobios mesófilos, debería ser menor. Aunque esto puede ser verdad, el proceso de manipulación durante y después de la producción, así como las condiciones de almacenamiento en la producción a nivel artesanal no son las idóneas, lo que se refleja en recuentos de aerobios mesófilos mayores para el queso de hoja artesanal en comparación con su contraparte producida a nivel industrial.

Los resultados del recuento de aerobios mesófilos en el queso de hoja industrial y artesanal deben relacionarse con los recuentos de otros microorganismos indicadores en términos de control de calidad, debido a que en los productos fermentados como el queso, se encuentran de forma natural altas poblaciones de bacterias mesófilas sin ninguna relación con la calidad (Silva et al., 2013, p. 57-72).

El recuento de aerobios mesófilos además de indicar la calidad microbiológica general de un producto, relacionada con las prácticas de higiene de acuerdo al nivel de producción, puede estar asociado con la prevalencia de microorganismos beneficiosos como las bacterias ácido lácticas. En este sentido los recuentos del análisis de aerobios mesófilos son mayores en los quesos artesanales ya que los tratamientos térmicos son menos drásticos y puede haber una prevalencia mayor de la microbiota autóctona formada por BAL en comparación con sus homólogos producidos a nivel industrial. Estos resultados deben relacionarse con los recuentos realizados en medios selectivos para bacterias ácido lácticas. Debe considerarse el establecimiento de un equilibrio entre la elaboración de productos lácteos que cumplan con los requisitos microbiológicos de calidad y su aporte de microorganismos beneficiosos como las BAL.

3.1.2 Recuentos de coliformes y *Escherichia coli*

En la tabla 2-3 se presentan los resultados de coliformes y *Escherichia coli* de las muestras en estudio en log UFC/g, junto con los índices máximos permisibles. La NTE INEN 1528 para queso fresco no madurado establece un límite máximo de 4,32 log UFC/g de coliformes y 1,00 log UFC/g para *Escherichia coli*.

Tabla 2-3: Resultados del recuento de coliformes y *Escherichia coli* en queso de hoja

Muestras	Coliformes		<i>Escherichia coli</i>	
	Log X y DE	Log índices máximos permisibles	Log X y DE	Log índices máximos permisibles
QHA1	5,67 ^a ± 0,08	4,32	1,80 ^a ± 0,06	1,00
QHA2	6,56 ^a ± 0,17	4,32	0,00	1,00
QHA3	6,35 ^a ± 0,10	4,32	1,67 ^a ± 0,00	1,00
QHI1	3,64 ^b ± 0,07	4,32	0,00	1,00
QHI2	3,65 ^b ± 0,07	4,32	0,00	1,00

^a Los datos son los valores promedio de dos muestras del mismo origen ± desviación estándar.

^b Los datos son los valores promedio de tres muestras del mismo origen ± desviación estándar.

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Se ha determinado que todos los quesos de hoja de origen artesanal analizados sobrepasan el índice máximo permisible de 4,32 log UFC/g para coliformes, mientras que los quesos de hoja de origen industrial cumplen con lo establecido por la norma NTE INEN 1528. Respecto al análisis de

Escherichia coli, los QHA1 y QHA3 presentan recuentos elevados, a excepción del QHA2 que se encuentra dentro del índice máximo permisible de 1,00 log UFC/g, al igual que los quesos de hoja industriales.

El recuento elevado de coliformes indica que hubieron fallas en el proceso de elaboración de los quesos de hoja artesanales ya que estos microorganismos pueden ser fácilmente destruidos por el calor utilizado en las diversas etapas de elaboración (Doyle, 2013, pp. 291-312) ya sea durante la pasteurización o durante el estiramiento de la cuajada. Además, es indicador de recontaminación del producto, por la utilización de equipos que no han sido limpiados de manera correcta antes de la producción.

El elevado conteo de coliformes en los quesos de hoja artesanales indican prácticas sanitarias deficientes en la producción, que pueden relacionarse con la presencia de patógenos entéricos (Britz y Robinson, 2008, p. 218), como *Escherichia coli*, que se encuentra en los QHA1 y QHA3 excediendo los índices máximos permisibles por la norma. En contraste con estos resultados, los quesos de hoja industriales cumplen con los requisitos microbiológicos de coliformes y presentan 0,00 log UFC/g de *Escherichia coli*.

Los recuentos de *Escherichia coli* permiten establecer que existe contaminación fecal en los quesos de hoja artesanales, por lo que el consumidor en caso de ingerir estos productos puede estar expuesto a bacterias entéricas. Las técnicas de producción artesanal no siempre siguen procedimientos estandarizados que garanticen un queso libre de contaminantes patógenos, en comparación con la producción a nivel industrial, donde se realizan controles dentro del proceso de elaboración. Sumado a esto los quesos de hoja artesanales son elaborados de acuerdo prácticas ancestrales que incluyen la utilización de materiales de madera que no son aptos para una limpieza y desinfección adecuadas, o no han sido validadas las técnicas de limpieza y desinfección en este tipo de utensilios, constituyendo así una fuente de contaminación del producto.

No existen normas regulatorias exclusivas para los quesos producidos a nivel artesanal, que se adapten a su proceso de elaboración (Domínguez-López et al., 2011), sin embargo, eso no les exime de cumplir con los requisitos microbiológicos que reflejen un producto de buena calidad, lo cual se logra aplicando buenas prácticas de higiene que no se evidencian en la producción artesanal de acuerdo con el recuento de estos microorganismos indicadores.

En la investigación realizada por Castro, et al., (2013, p. 107) sobre la caracterización de la microbiota nativa del queso Oxaca tradicional en tres fases de elaboración, se determinó la presencia de $9,0 \pm 0,9$ log UFC/g de coliformes totales en el queso, constituyendo un peligro para la salud del consumidor, los resultados de la presente investigación también exceden la norma pero se encuentran entre 6 log UFC/g.

3.1.3 Recuentos de *Staphylococcus aureus*

En la tabla 3-3 se presenta los resultados obtenidos en el análisis de *Staphylococcus aureus* de las 5 muestras de queso de hoja artesanal e industrial en log UFC/g, al igual que el índice máximo permisible (2,00 log UFC/g) de acuerdo a la norma NTE INEN 1528 para queso fresco no madurado.

Tabla 3-3: Resultados del recuento de *Staphylococcus aureus* en queso de hoja

<i>Staphylococcus aureus</i>		
Muestra	Log X y DE	Log índices máximos permisibles
QHA1	$3,46^a \pm 0,04$	2,00
QHA2	$3,38^a \pm 0,07$	2,00
QHA3	$3,41^a \pm 0,11$	2,00
QHI1	0,00	2,00
QHI2	0,00	2,00
^a Los datos son los valores promedio de dos muestras del mismo origen \pm desviación estándar.		
^b Los datos son los valores promedio de tres muestras del mismo origen \pm desviación estándar.		

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Todas las muestras de queso de hoja de origen artesanal sobrepasan el límite máximo. Los quesos de origen industrial, no presentan contaminación con *Staphylococcus aureus*. Los recuentos más bajos en el control de calidad microbiológica se obtienen para *Staphylococcus aureus*, sin embargo, todos los quesos de hoja artesanal sobrepasan los límites permitidos por la norma. Estos resultados indican la existencia de condiciones de higiene inadecuadas (Erkmen y Bozoglu, 2016, pp. 188), en la producción artesanal ya que este microorganismo indica un manejo inadecuado del producto después del proceso de pasteurización que da como resultado la contaminación por transmisión humana.

Staphylococcus aureus es un microorganismo que se encuentra principalmente en las manos de los manipuladores del alimento (Lelieveld, et al., , 2014, pp. 561-565), por lo que es fundamental la práctica de normas correctas de higiene en la elaboración del queso de hoja artesanal. El uso de mascarillas, guantes y gorros evita la contaminación del producto. En la producción a nivel artesanal no se usan barreras de protección ya que el proceso de elaboración se realiza principalmente a mano, ya que la contribución directa del artesano permanece como componente substancial del producto terminado (Domínguez-López et al., 2011, p. 172).

Por su lado, el queso de hoja industrial no refleja dicha contaminación ya que su proceso de elaboración debe cumplir obligatoriamente con buenas prácticas de manufactura, evitando así la contaminación del producto luego del proceso de pasteurización, además en la industria los procesos de producción son en lo posible automatizados evitando así la manipulación continua del personal (Donnelly, 2016, p. 376).

El queso de hoja artesanal es almacenado a temperatura ambiente para su consumo inmediato como queso fresco. La hoja de achira es la única barrera de protección entre el queso y los microorganismos contaminantes como *Staphylococcus aureus* que se encuentra en las manos de los expendedores, por lo que se debería establecer prácticas de empaque y almacenamiento adecuadas que garanticen la seguridad del producto.

Una característica que merece ser mencionada dentro de los factores que influyen en la calidad microbiológica del queso de hoja es su empaque. El queso de hoja elaborado a nivel artesanal (QHA1, QHA2, QHA3) es envuelto en una hoja de achira, también mencionada en la definición de queso de hoja de la norma NTE INEN 1528.

La hoja de achira (*Canna edulis*), también cultivada en Ecuador (Caballero, 2003, p. 5963) puede constituir una fuente de contaminación del producto. *Staphylococcus aureus* es un microorganismo común en las mucosas de los seres humanos, pero también se pueden encontrar en las superficies de las plantas (Erkmen y Bozoglu, 2016, p. 188). Por su parte el grupo coliforme también se encuentran entre las bacterias que comúnmente se encuentran en la materia prima de origen vegetal (Wang; 2017, pp. 53 95).

En algunos países de América del sur, las hojas, fueron y siguen siendo utilizadas profusa y tradicionalmente para el envasado de alimentos, que más allá de funcionar como barreras de protección pueden conferir ciertas características especiales a los alimentos (Masuelli, 2018, pp. 41-47),

sin embargo el impacto de su contenido microbiológico en los alimentos también debería ser analizado.

Por su parte el queso de hoja industrial es envasado al vacío en una funda de polietileno, brindando una mayor protección al producto en comparación con la hoja de achira que podría constituir una fuente de microorganismos patógenos, sino ha sido expuesta a un proceso de esterilización previa a su utilización como material de empaque en el queso de hoja artesanal.

El empaque final de los quesos de hoja influye en su calidad microbiológica y en el tiempo de vida útil. Según Marotta et al., (2017,p 6) los productos artesanales no sufren procesos de estabilización como un envasado especial, lo que deriva en un tiempo de vida útil más corto, generalmente de 3 días para el queso de hoja de origen artesanal. En cambio, el queso de hoja industrial, gracias a la aplicación de tecnologías alimentarias innovadoras como el envasado en atmosfera modificada, puede tener un tiempo de vida útil mayor. La combinación de estos factores junto con una temperatura de almacenamiento adecuada puede prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos y de aquellos asociados con el deterioro.

Sobre la base de los resultados, es importante sensibilizar a los productores artesanales sobre el uso de barreras higiénicas, mejoras en las prácticas de producción y en las medidas para controlar el proceso de producción (Rosengren et al., 2010, p. 267).

3.2 Resultados del recuento de bacterias ácido lácticas

La tabla 4-3 contiene los resultados del recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) realizado en medios de cultivo selectivos para bacilos (MRS) y cocos (M17). La norma NTE INEN 1528 para queso fresco no madurado no establece el índice máximo permisible para el recuento de estos microorganismos, sin embargo, el reglamento de la Comunidad Europea (CE) n.º 2527/98, de 25 de noviembre de 1998, relativo a las características de la mozzarella, de conformidad con el reglamento (CE) n.º 2515/94, exige para el queso mozzarella la presencia de "microflora típica resistente al estiramiento de la cuajada, en una cantidad no inferior a 7 log UFC/g, en muestras analizadas dentro de los tres días posteriores a la fecha de producción " (CE, 1998, p. 18).

Tabla 4-3: Recuento microbiano en MRS y M17

MUESTRA	MRS	M17
	Log X y DE	Log X y DE
QHA1	9,16 ^a ± 0,27	9,39 ^a ± 0,26
QHA2	8,76 ^a ± 0,09	9,15 ^a ± 0,34
QHA3	9,35 ^a ± 0,22	9,41 ^a ± 0,15
QHI1	7,82 ^b ± 0,04	8,27 ^b ± 0,04
QHI2	7,06 ^b ± 0,08	7,70 ^b ± 0,06
^a Los datos son los valores promedio de dos muestras del mismo origen ± desviación estándar.		
^b Los datos son los valores promedio de tres muestras del mismo origen ± desviación estándar.		

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Todas las muestras de queso de hoja ya sean de origen artesanal o industrial poseen recuentos mayores a 7 log UFC/g, cumpliendo con los requisitos microbiológicos del reglamento de la Comunidad Europea. Los recuentos de bacterias ácido lácticas son mayores en los quesos de hoja artesanales en comparación con los quesos de hoja industriales tanto en MRS como en M17. Se puede observar un recuento ligeramente mayor de bacterias ácido lácticas en M17 para ambos tipos de quesos.

En el estudio sobre la caracterización molecular de la comunidad de *Lactobacillus* en el procesamiento tradicional del queso mozzarella realizado por Morea et al., (1998, pp. 53-60), se pudo determinar que la microflora cocoide era predominante en comparación con la prevalencia de *Lactobacillus*, ya que las cepas de este género al igual que de otras BAL disminuían con el tratamiento térmico asociado con el proceso de estiramiento. Por lo que es lógico encontrar mayores recuentos de bacterias ácido lácticas en M17(cocos) tanto en los quesos de hoja artesanales como industriales, ya que algunas especies como las del género *Enterococcus* o especies como *Streptococcus thermophilus* son capaces de sobrevivir a altas temperaturas (Bergey 2009, p. 708).

Los quesos de hoja artesanales presentan recuentos similares en MRS a los obtenidos por Castro, et al., (2013, p. 107) de 9,8±0,8 log UFC/g para el recuento de bacterias ácido lácticas en el queso tradicional Oxaca, elaborado de forma artesanal con leche cruda. Este es un queso fresco de pasta hilada, muy popular en México, elaborado con leche cruda o pasteurizada, de forma industrial y artesanal (Córdova, et al., 2016, p. 6).

En el estudio realizado por Enríquez, et al., (2016, p. 3) sobre la caracterización de la microbiota aislada del queso tradicional hondureño, proveniente de dos productores, industrializados y artesanos se obtuvieron recuentos de BAL que variaron de 1,00 a 8,95 log UFC/g, con un promedio general de 4.76 ± 1.99 log UFC/g. Los resultados no son similares como los encontrados en la presente investigación ya que la mayor parte de quesos tradicionales no siguen un proceso de elaboración estandarizado y los productos no exhiben características uniformes, además la constitución físico química de la leche usada en la producción puede variar de acuerdo a la región.

Coppola, et al.,(2006, p. 267) evaluó la diversidad microbiana del queso, Fior di Latte, un queso fresco de pasta hilada, tradicionalmente elaborado a partir de leche cruda en las regiones del sur de Italia y consumido a los dos o tres días después de la fabricación. Los resultados muestran un mayor recuento de cocos en el agar M17 en comparación con el recuento de bacilos en el agar Rogosa, que se asemejan a los resultados obtenidos en la presente investigación ya que los recuentos de cocos en agar M17 superan a los de bacilos en agar MRS, independientemente de la forma de producción.

En el trabajo sobre la identificación microbiológica de las bacterias ácido lácticas presentes en 7 quesos mozzarella fabricados tradicionalmente a partir de leche de vaca, efectuado por De Candia et al., (2007, p. 182-191) se encontró que el número de BAL variaba de acuerdo al queso. Sin embargo, el mayor recuento de lactobacilos mesófilos fue de 8.4 ± 0.2 log UFC/g en agar MRS y de 8.8 ± 0.3 log UFC/ g en M17, coincidiendo con la presente investigación ya que se obtuvo aproximadamente 9 log UFC/g para el queso de hoja artesanal y 7 log UFC/g para el queso de hoja industrial, que no serían tan lejanos a los obtenidos por De Candia et al., tomando en cuenta que las condiciones de producción al igual que el lugar de origen no son los mismos.

Uno de los beneficios de las BAL es su capacidad de aumentar la vida útil del queso fresco debido a la producción de compuestos antimicrobianos (Osman, et al., 2010, p. 532) que se sustenta en numerosos estudios que han demostrado la capacidad de las bacterias ácido lácticas para eliminar la prevalencia de microorganismos patógenos en los productos que las contienen (Arques et al., 2005,; Pinto et al., 2011; Yang et al., 2012; Dalié, et al., 2010).

En este estudio el queso de hoja artesanal presenta recuentos elevados de microorganismos patógenos, pudiendo las bacterias ácido lácticas ejercer cierto control sobre el crecimiento de éstos microorganismos indeseables, pero puede ser que la contaminación en el caso de los quesos artesanales sea tan alta que no puede ser disminuida, debiendo realizarse estudios que confirmen la capacidad antimicrobiana de los aislados de BAL del presente estudio para confirmar.

Torres et al., (2005, p. 684), expone que la elaboración de quesos a nivel industrial puede dar como resultado productos uniformes con una mejor calidad microbiológica. El proceso de pasteurización puede eliminar los microorganismos patógenos, pero también puede eliminar la microbiota autóctona responsable del desarrollo del sabor. El recuento de bacterias ácido lácticas es mayor para los quesos de hoja artesanales tanto en MRS como en M17, en cambio los quesos de hoja industriales revelan un recuento ligeramente menor que puede ser consecuencia de su proceso de elaboración.

3.3 Aislamiento y selección de cepas de bacterias ácido lácticas

Una vez realizados los recuentos de las BAL se procedió al aislamiento y posterior caracterización de cepas aisladas de los medios MRS y M17. En la tabla 5-3 se muestra el total de cepas aisladas.

Tabla 5-3: Total de cepas BAL aisladas

Código	Origen	Morfología microscópica	Medio de aislamiento	Numero de cepas	Porcentaje (%)	Total de cepas
BA	Artesanal	Bacilos	MRS	13	56.25	32
BI	Industrial			5		
CA	Artesanal	Cocos	M17	8	43.75	
CI	Industrial			6		
BA: bacilos aislados de QHA. BI: bacilos aislados de QHI. CA: cocos aislados de QHA. CI: cocos aislados de OHI.						

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Al final del aislamiento se seleccionaron 32 cepas de bacterias ácido lácticas el 56.25% (18 cepas) fueron aisladas en MRS, el 43.75% (14 cepas) fueron aisladas en M17. De acuerdo a los resultados del recuento microbiano en los medios de cultivo selectivos para BAL, se obtuvieron mayores recuentos para el queso de origen artesanal en comparación con el de origen industrial, por lo que es de esperar que el porcentaje de cepas aisladas también sigan la misma secuencia, debido a que los quesos artesanales poseen una microbiota autóctona muy diversa.

En cuanto a las características macroscópicas de los aislados del medio de cultivo MRS, se caracterizaron por formar colonias redondas, cremosas, con bordes regulares características de BAL. En el medio de cultivo M17 se obtuvieron colonias redondas, de borde regular; una característica particular fue que las colonias presentaban un color iridiscente al comienzo de su crecimiento, pero

con el paso del tiempo fueron tomando el característico color blanco, cremoso. De acuerdo a sus características microscópicas, las 32 cepas aisladas son Gram positivas. Además, son catalasa y oxidasa negativa y no presentan movilidad.

3.3.1 Pruebas de caracterización de los aislados en MRS

En la tabla 6-3 se presentan los resultados del crecimiento de bacilos a diferentes condiciones. Las 18 cepas aisladas exhiben características de crecimiento variables, para facilitar su estudio se las puede clasificar en 4 grupos tal como se indica en el Grafico 1-3

Tabla 6-3: Caracterización de cepas aisladas en MRS

Código	Crecimiento a 10°C	Crecimiento a 45°C	Crecimiento en NaCl 6.5%	Crecimiento en NaCl 18%	Crecimiento a pH 4.4	Crecimiento a pH 9.6	CO ₂ a partir de la glucos
BA1	+	+	+	-	+	+	-
BA2	+	+	+	-	+	+	_*
BA3	+	+	+	-	+	-	-
BA4	+	+	+	-	+	+	-
BA5	+	+	+	-	+	+	-
BA6	+	+	+	-	+	-	-
BA7	+	+	+	-	-	-	-
BA8	+	+	+	-	+	-	-
BA9	+	+	+	-	+	+	-
BA10	+	+	+	-	+	+	-
BA11	+	+	-	-	-	+	-
BA12	+	+	+	-	+	+	-
BA13	+	+	+	-	+	-	-
BI1	+	+	-	-	-	-	-
BI2	+	+	+	-	+	+	-
BI3	+	+	+	-	+	-	-
BI4	+	+	+	-	+	+	-
BI5	+	+	+	-	+	-	-

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

La mayoría de las BAL pueden crecer en MRS, ya que algunos géneros son fisiológicamente similares y comparten los mismos requerimientos nutricionales, estas bacterias crecen a un pH de 6.2 (Man Rogosa Shape, 2003, pp. 511-513), y los *Lactobacillus* se desarrollan óptimamente en un rango de 5-6.5 (Corry, et al., 2012, p. 817). En el presente trabajo de investigación se acidificó el medio MRS hasta un pH 5.4, para seleccionar a las BAL del resto de la microbiota del queso.

Todas las cepas aisladas crecen a las temperaturas de 10°C y 45°C, algunas especies como *Lactobacillus rhamnosus* (Bergey 2009), pueden desarrollarse en estos dos rangos de temperatura, sin embargo es poco común encontrar un crecimiento simultáneo de cepas a 10°C y 45°C ya que de acuerdo sus características microscópicas no todas las cepas son iguales. Para responder a las condiciones estresantes, como son los cambios bruscos de temperatura, las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos adaptativos a nivel genético, debido a que las bacterias relacionadas con los alimentos están sujetas a cambios bruscos de temperaturas durante la manipulación y conservación. Estudios recientes han demostrado que las BAL pueden adaptarse a cambios repentinos de temperatura, que son quizá el estrés más común al que se enfrentan, mediante la activación de las proteínas del choque térmico cuando hay elevación de la temperatura (Doyle, 2016, pp. 55); o de proteínas inducidas por el frío cuando hay ambientes muy fríos, garantizando así su supervivencia (Doyle, 2016, p. 92).

En cuanto al crecimiento de BAL en el caldo MRS con NaCl 6.5% se observa el crecimiento de todas las cepas a excepción de BA11 y BI1. Las cepas BA7 y BI3 toleran NaCl al 6,5% pero su crecimiento fue lento ya que pudo observarse sólo hasta las 48 horas. El crecimiento de las cepas en caldo MRS con NaCl 18% fue negativo, la mayoría de las BAL no crecen a esta concentración a excepción de especies del género *Tetragenococcus* (Bergey, 2009).

Las cepas muestran una mayor variabilidad de crecimiento a diferentes valores de pH. Las cepas BA7, BA11, BI1 no se desarrollan a pH 4.4 mientras que en pH 9.6 tampoco crecen BA3, BA6, BA7, BA8, BA13, B13, BI1, BI3, BI5. Dentro de las BAL solo los géneros *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus* se desarrollan a pH 9.6 pero tienen la forma de cocos. El crecimiento de las cepas dentro del género *Lactobacillus* a pH 4.4 es variable (Salmien, 2012, p. 3).

Las 18 cepas son negativas para la producción de CO₂ a partir de la fermentación de la glucosa. Se pudieron notar diferencias en algunas cepas durante el desarrollo de la prueba, ya que se observó crecimiento de las cepas BA2, BA7, BI3 por la formación de precipitado, sin embargo, no hubo viraje del color del medio de naranja-rojizo a amarillo, que demuestra que no hubo fermentación del carbohidrato. Ninguna de las cepas forma CO₂ producto de la fermentación de la glucosa, debido a que las cepas aisladas del queso de hoja no deberían ser formadoras de gas ya que los quesos de pasta hilada, dentro de los cuales se podría clasificar al queso de hoja, no posee aberturas en su composición interna, que es característica de algunos quesos madurados como el Gouda (McSweeney, et al., 2017, p.

866). La no producción de gas nos permite denominar estas bacterias como bacilos homofermentativos, ya que el principal producto de su metabolismo es ácido láctico. Mientras que las BAL heterofermentativas que tienen como producto final la formación de ácido láctico, además de otros compuestos entre los que se encuentran el dióxido de carbono.

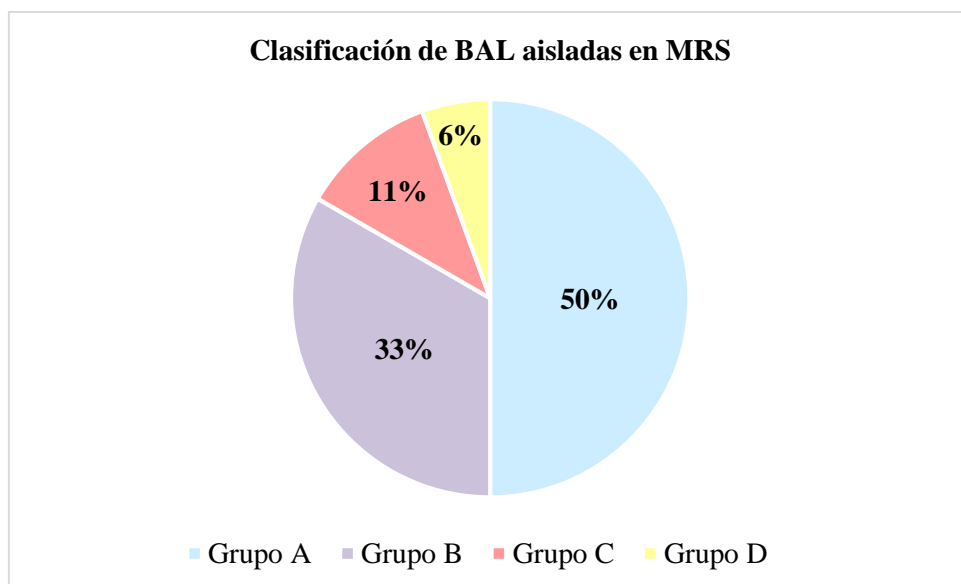


Gráfico 1-3: Bacilos agrupados de acuerdo a sus características fisiológicas.
Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

En el gráfico 1-3, se presentan los 4 grupos en los que se han asociado las 18 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas en medio MRS, los cuales presentan las siguientes características:

- **Grupo A:** Crecimiento a 10°C y 45°C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (+); pH 9.6 (+); CO₂ de la glucosa (-).
- **Grupo B:** Crecimiento a 10°C y 45°C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (+); pH 9.6 (-); CO₂ de la glucosa (-).
- **Grupo C:** Crecimiento a 10°C y 45°C (+); NaCl 6.5% (-); NaCl 18% (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (-); CO₂ de la glucosa (-).
- **Grupo D:** Crecimiento a 10°C y 45°C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (-); CO₂ de la glucosa (-).

De acuerdo al esquema de general de la tabla 2-1, propuesto por Lahtinem, et al., (2012, p 3) para clasificar a las bacterias ácido lácticas en diferentes géneros de acuerdo a sus características diferenciales, se podría establecer que el grupo B (6 cepas), Grupo C (2 cepas), Grupo D (1cepa) podrían estar dentro del género *Lactobacillus*. El esquema propuesto para la clasificación establece un crecimiento variable a diferentes temperaturas (10°C y 45°C), NaCl (6.5%), pH (4.4) y formación de CO₂ a partir de la glucosa, variable; además el desarrollo a pH de 9.6 y NaCl 18% debe ser negativo. Las cepas de los grupos anteriormente mencionados cumplen con dichas especificaciones a excepción del grupo A, ya que las cepas se desarrollan a pH 9.6.

De las 18 cepas aisladas en MRS, el 50% podrían agruparse dentro del género *Lactobacillus* mientras que el 50% restante del grupo A, según el esquema general de clasificación de Lahtinem, et al., (2012, p 3) no podrían pertenecer al género *Lactobacillus*, sin embargo, éste es un esquema general, que podría admitir excepciones. Estas cepas, incluso, podrían pertenecer a especies de BAL que aún no han sido identificadas.

Debido a que muchas BAL tienen requisitos nutricionales y de crecimiento similares, las metodologías bioquímicas de identificación no son concluyentes en muchos casos (Moraes et al., 2013, pp. 109-112) como se puede observar en los bacilos aislados en el medio de cultivo MRS, siendo necesario el uso de las pruebas bioquímicas tales como el sistema API 50CHL para una identificación fenotípica.

3.3.2 Pruebas de caracterización de los aislados en M17

Luego de realizar resiembras sucesivas en agar M17 con el objetivo de purificar los aislados, se obtuvieron 14 cepas de cocos Gram positivos, catalasa, oxidasa y movilidad negativas, como se puede observar en la Tabla 7-3.

Tabla 7-3: Caracterización de cepas aisladas en M17

Código	Crecimiento a 10°C	Crecimiento a 45°C	Crecimiento en NaCl 6.5%	Crecimiento en NaCl 18%	Crecimiento en pH 4.4	Crecimiento en pH 9.6	CO ₂ a partir de la glucosa
CA1	+	+	+	-	-	+	-
CA2	+	+	+	-	-	+	-
CA3	+	+	+	-	-	+	-
CA4	+	+	+	-	-	+	-
CA5	+	+	+	-	-	+	-
CA6	+	+	+	-	-	+	-
CA7	+	+	+	-	-	+	-
CA8	+	+	+	-	-	+	-
CI1	+	+	+	-	-	+	-
CI2	+	+	+	-	-	+	-
CI3	+	+	+	-	-	+	-
CI4	+	+	+	-	-	+	-
CI5	+	+	+	-	-	+	-
CI6	+	+	+	-	-	+	-

Realizado por: Jhoana Vargas, 2018

Las cepas aisladas en M17 muestran resultados similares para cada prueba, es decir, no existe mucha variabilidad en cuanto a su crecimiento en diferentes condiciones en comparación con los aislados de MRS. Todas las cepas crecen a 10°C y 45°C, en NaCl al 6.5%, pH 9.6 y no hay formación de CO₂ a partir de la fermentación de la glucosa. De acuerdo (Lahtinen, et al., 2012, p. 3) por estas características diferenciales podríamos clasificar a este grupo de bacterias dentro del género *Enterococcus*, porque coinciden con todos los parámetros analizados excepto en el crecimiento a pH 4.4.

Algunos autores mencionan como características fenotípicas para distinguir a *Enterococcus* de los demás géneros de BAL, el crecimiento a 10°C y 45°C, en 6.5% de NaCl y a pH de 9.6, además de su capacidad de sobrevivir al calentamiento a 60°C por 30 minutos (García 2016,; Morandi et al., 2005). Por lo anterior, también se podría establecer que las bacterias aisladas en M17 corresponden al género *Enterococcus*. Aunque no se ha realizado la prueba de sobrevivencia al calentamiento térmico, las cepas provienen del queso de hoja que al igual que el queso mozzarella, ha sido sometido a temperaturas ~70°C durante el proceso de estiramiento (Fuquay, et al., 2011, p. 768), lo que garantizaría la supervivencia de las cepas aisladas durante el tratamiento térmico. Además, de acuerdo con los resultados de la tabla 7-3, el recuento de cocos en M17 es ligeramente superior en comparación con los recuentos en MRS, lo que puede deberse a su capacidad de soportar altas temperaturas.

Los enterococos a menudo se identifican como componentes de la microbiota autóctona de los quesos artesanales de leche cruda y se cree que contribuyen a las características organolépticas únicas de

estos productos. Se obtienen recuentos elevados de cocos en M17, de las cuales algunas especies podrían estar vinculadas al género *Enterococcus*, mientras que otras podrían pertenecer a otro tipo de microorganismos ya que los recuentos en MRS que es un medio selectivo de BAL son menores.

Los enterococos son microorganismos ubicuos, por lo que su hábitat natural puede variar desde el tracto gastrointestinal de los humanos y animales hasta los alimentos fermentados como el queso. Su capacidad de soportar condiciones ambientales adversas, como pH, temperaturas, salinidad, los hace ideales para soportar las condiciones normales de producción de alimentos (Hui 2007, p. 86), por lo que pueden convertirse en una parte importante de la microflora de los alimentos pudiendo ser encontrados durante la fermentación, así como en los productos terminados.

Como ya se han mencionado anteriormente el género *Enterococcus* es quizá uno de los más controvertidos dentro de las BAL (Foulquié Moreno et al., 2006; Morandi et al., 2005, p. 181). Su naturaleza dualista hace que dependiendo de la cepa, puedan tener diversos usos dentro de la industria láctea, debido a que algunas especies son consideradas como microorganismos patógenos o causantes de deterioro, mientras que otras tienen implicaciones importantes por su uso como probióticos, por la producción de bacteriocinas (enterocinas), por su actividad como cultivos iniciadores en algunas variedades de queso, o como cultivos adjuntos responsables de las características organolépticas (Bhardwaj, et al.; García 2016)

En la revisión realizada por García (2016, p.3) se debate la presencia de *Enterococcus* en los productos lácteos ya que, a diferencia de la mayoría de las BAL, no se consideran como GRAS "generalmente reconocido como seguro". La presencia de estos microorganismos en los productos lácteos no se relaciona con contaminación fecal directa. La UE, no limita el número de enterococos en algunos alimentos, aduciendo que estos microorganismos tienen poco valor como indicadores de higiene en el procesamiento industrial de alimentos, en contraste con los coliformes y *E. coli*, que se utilizan como indicadores

Bhardwaj, et al., (2008, pp. 317-325) establecen que los diferentes niveles de enterococos en los quesos pueden variar de 4 log UFC/g hasta 9 log UFC/g, dependiendo del tipo de queso, temporada de producción, grado de contaminación de la leche y su supervivencia en el entorno lechero. A pesar de que muy muy pocos enterococos aislados de productos lácteos, muestran rasgos patogénicos, se debe prestar especial atención a su aislamiento ya que debe basarse en la selección de cepas sin propiedades patogénicas o que contengan genes de resistencia a antibióticos como la vancomicina.

El uso de técnicas fenotípicas y moleculares permite la caracterización exacta y la evaluación de la seguridad de las cepas de enterococos (García, 2016), que pueden ser usados de acuerdo a sus propiedades tecnológicas. Razón por la cual se deben estudiar los aislamientos realizados en M17 para realizar la identificación taxonómica, ya que los resultados de la caracterización fisiológica no son suficientes debido que (Morea y Cocconcelli 1999, pp. 574-582) encontraron que los resultados de la caracterización fisiológica no concordaban con los datos obtenidos a través de secuenciación genética, debido a la diversidad genética que posee el género *Enterococcus*, al igual que la mayoría de BAL.

CONCLUSIONES

La evaluación microbiológica comparativa de los quesos de hoja artesanales e industriales de la ciudad de Latacunga, determinó que el queso de hoja industrial cumple con los requisitos microbiológicos establecidos por la norma NTE INEN 1528, sin embargo, el queso de hoja artesanal sobrepasa los límites de la normativa, siendo este un riesgo para la salud del consumidor por los recuentos elevados de aerobios mesófilos, coliformes, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

El recuento de bacterias ácido lácticas en medios de cultivo selectivos (M17 y MRS) muestra que existe mayor crecimiento de BAL en los quesos de hoja elaborados de forma artesanal en comparación con el queso de hoja industrial, lo que pudiera atribuirse a su proceso de elaboración.

Los aislamientos de las bacterias ácido lácticas del queso de hoja realizados en base a las características macroscópicas y microscópicas de las colonias, permitió seleccionar 32 cepas de bacterias Gram positivas, catalasa, oxidasa y movilidad negativas; de las cuales el 56,25% son bacilos y 43,75% son cocos.

Las pruebas de caracterización, muestran que el 50% de las cepas aisladas en medio MRS podrían corresponder al género *Lactobacillus* y las cepas aisladas en medio M17 al género *Enterococcus*. sin embargo, son necesarias más pruebas de identificación bioquímica como el sistema API 50 CHL, así como pruebas de identificación genética.

RECOMENDACIONES

Informar a los organismos responsables de la vigilancia de la calidad microbiológica de los alimentos sobre los resultados obtenidos, para que se realicen charlas de capacitación dirigidas a los productores artesanales, con el objetivo de conservar la tradición del queso de hoja, y a su vez contribuir a la elaboración de productos que cumplan con los requisitos de calidad microbiológica sin constituir una fuente de microorganismos patógenos que afecten la salud del consumidor.

Realizar el análisis bromatológico del queso de hoja de origen industrial y artesanal ya que estas características también influyen en la calidad microbiológica del queso.

Complementar la evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional de la ciudad de Latacunga con un análisis sensorial para evaluar la influencia de BAL sobre las características organolépticas de los quesos.

Dar un mantenimiento periódico de las cepas de BAL conservadas en congelación a -20°C.

Realizar estudios de identificación bioquímica de las cepas BAL aisladas, por medio de las pruebas API, y biología molecular, con el objetivo de identificar el género y especie, para redirigir estudios posteriores.

Realizar pruebas para identificar la capacidad tecnológica de las cepas BAL como por ejemplo la capacidad acidificante, la actividad proteolítica, entre otras.

BIBLIOGRAFÍA

3M. *Petrifilm Guía de Interpretación*. [en línea]. 2017. [Consulta: 14 mayo 2017]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf.

ACEVEDO, I; GARCÍA, O; VARGAS, D. "Evaluación de la calidad bacteriológica por Método Rida®Counten Quesos Tipo Mozzarella de Bufala Artesanal". *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Barquisimeto, Estado de Lara, Venezuela* [en línea], vol. 6, no. 2, pp. 39-45. [Consulta: 12 marzo 2018]. Disponible en: <https://revistacmvl.jimdo.com/suscripción/volumen-6/queso-mozzarella/>.

AMERICAN CHEESE SOCIETY. *Cheese Definitions and Categories*. [en línea]. 2012 [Consulta: 19 enero 2018]. Disponible en: <http://www.cheesesociety.org/events-education/cheese-definitions/>.

ARQUES, J.L., et al. "Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria". *Journal of Applied Microbiology*, 2015, vol. 98, no. 2, pp. 254–260. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02507.x.

BACHA, et al.,. "Antimicrobial susceptibility patterns of LAB isolated from wakalim, a traditional ethiopian fermented sausage". *Journal of Food Safety*, 2010, vol. 30, no. 1, pp. 213–223. ISSN 01496085. DOI 10.1111/j.1745-4565.2009.00201.x.

BATT, C; TORTORELLO, M. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Second. London: Elsevier Academic Press, 2015, pp. 442-666.

BERGEY. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2009, Second. United States of America: Springer, p. 708.

BHARDWAJ, et al.,. "Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods". *Indian Journal of Microbiology*, 2008, vol. 48, no. 3, pp. 317–325. ISSN 00468991. DOI 10.1007/s12088-008-0041-2.

BRITZ, T.J. y ROBINSON, R.K. *Advanced Dairy Science and Technology*. United Kingdom:

Blackwell Publishing Ltd, 2008, pp. 212-220.

CABALLERO, B. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. United States of America: Academic Press, 2003, p. 5963.

CANO, S. Métodos de análisis microbiológico. Normas Iso. *Analiza calidad*, 2006, pp. 35.

CAPLICE, E. y FITZGERALD, G. "Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation". *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 50, no. 1–2, pp. 131–149. ISSN 01681605. DOI 10.1016/S0168-1605(99)00082-3.

CASTRO, G; et al. "Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 2013, vol. 33, no. 2, pp. 105–109.

CÓRDOVA, A; et al. "Invited review : Artisanal Mexican cheeses". *American Dairy Science Association*, 2016 vol. 99, pp. 1–13. DOI 10.3168/jds.2015-10103.

CORRY, et al. *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*, Third. S.l.: The Royal Society Of Chemistry, 2012, pp.174- 817

DALIÉ, et al. "Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins". *Journal of Food Control*, 2010, vol. 21, pp. 370–380.

DE CANDIA, S., et al. "Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses". *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 119, no. 3, pp. 182–191. ISSN 01681605. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.062.

DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, A., et al. "Alimentos artesanales y tradicionales: el queso Oaxaca como un caso de estudio del centro de México". [en línea], 2011, (México), vol. 19, no. 38, pp. 165–193. [Consulta: 11 febrero 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-45572011000200007&script=sci_arttext&tlng=pt.

DONNELLY, C. *Cheese and microbes*. United States of America: ASM PRESS, 2014, pp. 40-379.

DONNELLY, C. *The Oxford Companion to Cheese*. United States of America: Oxford University Press, 2016, pp. 43-519.

DOYLE, et al. *Food Microbiology : fundamentals and frontiers*. Fourth. Washington: ASM PRESS, 2013, pp. 291- 312.

DOYLE, M. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. New York: Springer, 2016, pp. 55-92

ENRIQUEZ, L; et al. "Characterization of Microbiota Isolated from Traditional Honduran Cheese". *Journal of Food & Industrial Microbiology*. [en línea], 2016, vol. 2, no. 2, pp. 1–7. [Consulta: 21 enero 2018]. DOI 10.4172/2572-4134.1000117. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/characterization-of-microbiota-isolated-from-traditional-honduran-cheese.php?aid=83273>.

ERKMEN, O; BOZOGLU, F. *Food microbiology: principles into practice*. United Kingdom: Willey, 2016, p. 188

EUROPA, COMUNIDAD EUROPEA. 2018. *Reglamento (CE) No 2527/98 de la comisión de 25 de noviembre de 1998 por el que se completa el anexo del Reglamento (CE) no 2301/97 relativo a la inscripción de determinadas denominaciones en el Registro de certificaciones de características específicas e.* 1998. S.l.: s.n. REGLAMENTO (CE) No 2527/98.

FDA. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001, Ninth. United States of America: s.n.

FERRARI, I. et al. "Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of Salmonella typhi in artisanal cheese". *Food Microbiology* [en línea], 2016 vol. 60, pp. 1-35. ISSN 10959998. DOI 10.1016/j.fm.2016.06.014. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.014>

FLOROU-PANERI, P., CHRISTAKI, E. y BONOS, E. "Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients". *R & D for Food, Health and Livestock Purposes* [en línea], 2013. [Consulta: 6 febrero 2018]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-as-source-of-functional-ingredients>.

FOX, P., et al. *Fundamentals of Cheese Science*. Second. New York: Springer, 2017, pp 9-87

FUQUAY, et al. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second. London: Elsevier Academic Press, 2011, pp. 534-745

GARCÍA, G. "Lactic Acid Bacteria : *Enterococcus* in Milk and Dairy Products". *Module in Food Sciences*, 2016, pp. 1–8. DOI 10.1016/B978-0-08-100596-5.00848-9.

GOLIĆ, N., et al. "Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia". *International Journal of Food Microbiology*, 2013, vol. 166, no. 2, pp. 294–300. ISSN 01681605. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032.

HOLZAPFEL, W; WOOD, B. *Lactic Acid Bacteria: biodiversity and taxonomy*. United Kingdom: Willey, 2014, pp. 13-123

HUI, Y.H. *Handbook of Food Products Manufacturing*. New Jersey: Willey, 2007, p.86

INEC. *Información estadística*..[en línea], 2016. [Consultado 07 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas/>

KLAENHAMMER, et al. "Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health". *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, vol. 29, no. 3 SPEC. ISS., pp. 393–409. ISSN 01686445. DOI 10.1016/j.femsre.2005.04.007.

LAHTINEM, S. et al. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Fourth. New York-USA, 2012, pp. 3-121

LELIEVELD, H; et al. *Hygiene in food procesing*. Second. USA: Woodhead Publishing Limited, p.561

LORTAL, et al. "Wooden Tools: Reservoirs of Microbial Biodiversity in Traditional Cheesemaking". *Microbiology spectrum*, 2014, vol. 2, pp. 1–11. ISSN 2165-0497. DOI 10.1128/microbiolspec.CM-0008-2012.

MAN, D. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar. 2003, pp. 511–513.

MAROTTA, S.M., et al. "Industrial and artisanal fresh filled pasta: Quality evaluation". *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, vol. 42, no. 1, pp. 1–8. ISSN 17454549. DOI 10.1111/jfpp.13340.

MASUELLI, M. *Biopackaging*. Argentina: CRC Press, 2018, p.41

MCSWEENEY, P. et al. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth. London: Elsevier Academic Press, 2017, pp. 251-278

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA, ECUADOR. Reglamento de Etiquetado de Alimentos Procesados para el Consumo Humano. 2013. Acuerdo No. 00004522. 2013, pp. 17.

MORAES, P.M., et al. "Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria". *Brazilian Journal of Microbiology* [en línea], 2003, vol. 44, no. 1, pp. 109–112. [Consulta: 6 enero 2018]. DOI 10.1590/S1517-83822013000100015. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

MORANDI, S., et al. "Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*". *Lait*, [en línea], 2005, pp. 181-192. [Consulta: 27 enero 2018]. DOI 10.1051/lait:2005006. Disponible en: <http://www.edpsciences.org/lait>.

MOREA, M., et al. "Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese". *International Journal of Food Microbiology*, 1998, vol. 43, no. 1–2, pp. 53–60. ISSN 01681605. DOI 10.1016/S0168-1605(98)00096-8.

MOREA, M., BARUZZI, F. y COCCONCELLI, P. "Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing". *Journal of Applied Microbiology*, [en línea], 1999, vol. 87, no. 4, pp. 574–582. [Consulta: 11 febrero 2018]. DOI 10.1046/j.1365-2672.1999.00855.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.1999.00855.x>

MORENO, M., et al. "The role and application of enterococci in food and health". *Int J Food Microbiology*, [en línea], 2006, pp. 1–24. [Consulta: 5 enero 2018]. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026. Disponible en: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/42004057/The_role_and_application_of_enterococci_20160203-30232-

NARVÁEZ, B. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas del queso de cabra artesanal del sureste de Coahuila. [en línea] (tesis) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México, 2015, pp. 18-20. [Consulta: 17 enero 2018]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7773>

NORMA (PRT-712.02-047): 2010. *Recuento de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en yogurt. Procedimiento.*

NTE INEN 1528: 2012. *Recuento de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus. Procedimiento*

NTE INEN 1529-2: 2013 *Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.*

NTE INEN 1529-5:2006. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos.*

OSMAN, M.; ABDALA, M.; NOUREIN, M. Chemical and Microbiological Evaluation of Mozzarella Cheese During Storage. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 532–536.

OYARZABAL, O. y BACKERT, S. *Microbial Food Safety: An Introduction.* New York-USA: Springer, 2012, pp.127-145.

OZER, B; AKDEMIR-EVRENDILEK, G. *Dairy Microbiology and Biochemistry.* New York-USA: CRC Press, 2015, pp.68-130

PALACIOS, R. Análisis de las comunidades microbianas autóctonas durante la maduración de quesos artesanales de dos regiones del Sur del Ecuador. [en línea] (tesis) Universidad del Azuay,

Ecuador, 2016, p. 2. [Consulta: 18 enero 2018]. Disponible en:
<http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/6671>

PAPADEMAS, P; BINTSIS, T. *Global Cheesemaking Technology. Cheese Quality and Characteristics*. United States of America: Willey, 2018, pp. 71-89.

PAPADEMAS, P. *Dairy microbiology: a practical approach*. New York-USA: CRC Press, 2015, pp. 69-113.

PAXSON, H. *The Life of Cheese Crafting Food and Value in America*. Los Angeles-USA: University of California Press, Ltd, 2013, pp. 128-157

PFEILER, E.A. y KLAENHAMMER, T.R. "The genomics of lactic acid bacteria". *Trends in Microbiology*, 2007, vol. 15, no. 12, pp. 546–553. ISSN 0966842X. DOI 10.1016/j.tim.2007.09.010.

PINTADO, M., et al. *Cheese Microbiology*. London, 2015, pp. 113–133.

PINTO, M.S., et al. "The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese". *International Dairy Journal*, 2011, vol. 21, no. 2, pp. 90–96. ISSN 09586946. DOI 10.1016/j.idairyj.2010.08.001.

PLAZA, L; MORALES, F. Análisis Microbiológico en Quesos Frescos que se expenden en presencia o ausencia de *Listeria* y *Salmonella*. [en línea] (tesis) Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, 2013, p. 6. [Consulta: 21 enero 2018]. Disponible en:
<http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/25404>

POLTRONIERI, P. *Microbiology in dairy processing: challenges and opportunities*. India: Wiley Blackwell, 2018, pp. 161-172

RICKE, et al. *Food Safety. Emerging Issues, Technologies and Systems*. United Kingdom: Academic Press, 2015, pp. 10-53

ROSENGREN, Å., et al. "Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies". *International Journal of Food Microbiology*, 2010, vol. 144, no. 2, pp. 263–269. ISSN 01681605. DOI

10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004.

SALVATORE COPPOLA, et al. "Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta - filata cheese of the Naples area". *Journal of Dairy Research*, 2006, pp. 264–272. DOI 10.1017/S0022029906001804.

SENPLADES, 2013. *Plan Nacional Buen Vivir 2013-2017*. Ecuador, 2013, s.n. ISBN 978-9942-07-448-5.

SILVA, N. Da, et al. *Examination Methods of Food and Water*. Brazil: CRC Press, 2013, pp. 57-92.

SUZZI, G., et al. "Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water-buffalo Mozzarella cheese". *Journal of Applied Microbiology*, 2001, vol. 88, no. 1, pp. 117–123. DOI 10.1046/j.1365-2672.2000.00926.x.

TORRES, M; et al. "Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese". *Journal of Food Control*, 2005, pp. 683–690.

VASIEE, A., BEHBAHANI, B.A. y YAZDI, F.T. "Diversity and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Horreh , a Traditional Iranian Fermented Food". 2017, DOI 10.1007/s12602-017-9282-x.

WANG, Y. *Food Spoilage Microorganisms: ecology and control*. London: CRC Press, 2017, pp. 53-95

YANG, E., et al. "Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts". [en línea], 2012, pp. 1–12. [Consulta: 7 febrero 2018]. DOI 10.1186/2191-0855-2-48. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186%2F2191-0855-2-48.pdf>

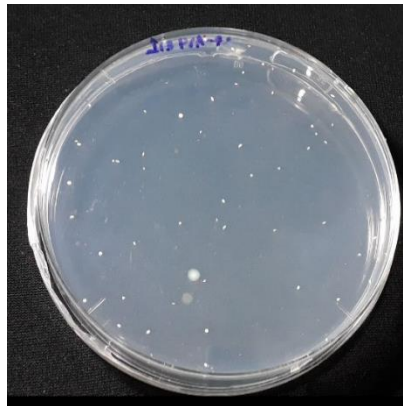
ANEXOS

ANEXO A. Queso de hoja tradicional de la ciudad de Latacunga.

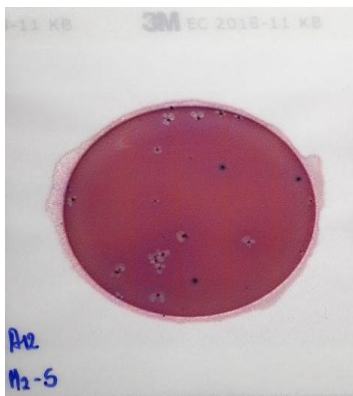


Fotografía 1A. Queso de hoja elaborado de forma artesanal

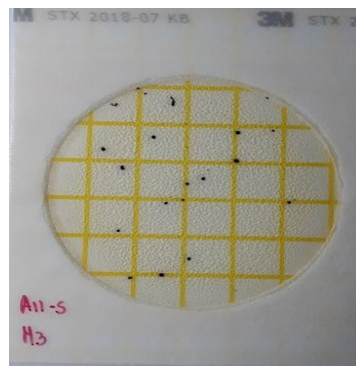
ANEXO B. Control de calidad del queso de hoja



Fotografía 1B. Recuento de aerobios mesófilos en agar PCA.



Fotografía 2B. Recuento de coliformes y *Escherichia coli*.



Fotografía 3B. Recuento de *Staphylococcus aureus*.

ANEXO C. Aislamiento de bacterias ácido lácticas

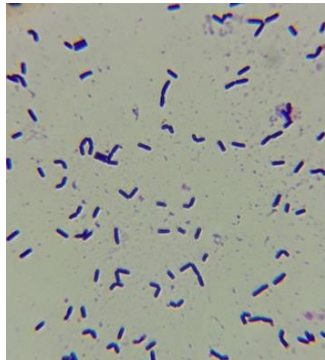


Fotografía 1C. Aislamiento de bacterias ácido lácticas en MRS.

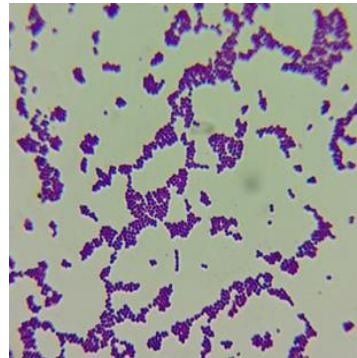


Fotografía 2C. Aislamiento de bacterias ácido lácticas en M17.

ANEXO D: Características microscópicas de las bacterias ácido lácticas

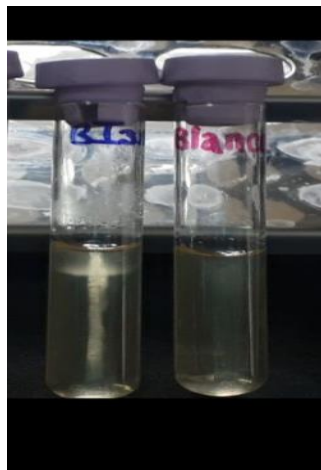


Fotografía 1D. Bacilos aislados en MRS.

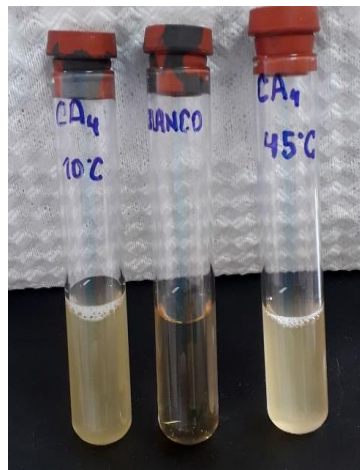


Fotografía 2D. Cocos aislados en M17

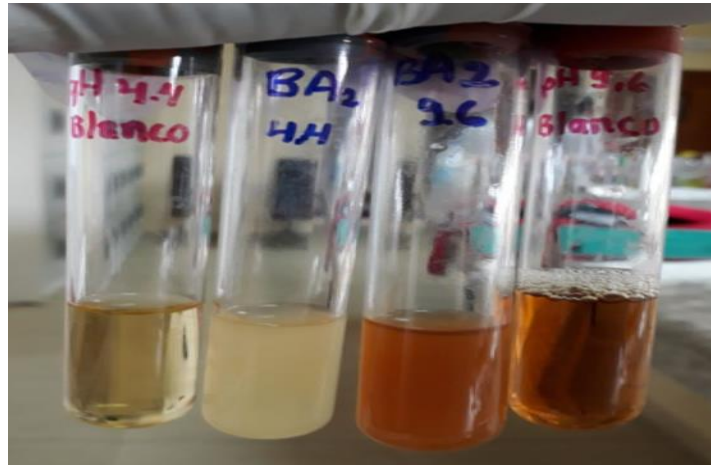
ANEXO E. Pruebas de caracterización de cepas BAL



Fotografía 1E. prueba de movilidad.



Fotografía 2E. Crecimiento a diferentes temperaturas.



Fotografía 3E. Crecimiento de BAL a pH 4.4 y 9.6.



Fotografía 4E. Crecimiento en caldo MRS con NaCl 6.5%



Fotografía 5E. Fermentación de glucosa.

ANEXO F: Total de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas en medios de cultivo MRS y M17.

#	Cepa	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa	Movilidad
1	BA1	positiva	negativa	negativa	negativa
2	BA2	positiva	negativa	negativa	negativa
3	BA3	positiva	negativa	negativa	negativa
4	BA4	positiva	negativa	negativa	negativa
5	BA5	positiva	negativa	negativa	negativa
6	BA6	positiva	negativa	negativa	negativa
7	BA7	positiva	negativa	negativa	negativa
8	BA8	positiva	negativa	negativa	negativa
9	BA9	positiva	negativa	negativa	negativa
10	BA10	positiva	negativa	negativa	negativa
11	BA11	positiva	negativa	negativa	negativa
12	BA12	positiva	negativa	negativa	negativa
13	BA13	positiva	negativa	negativa	negativa
14	BI1	positiva	negativa	negativa	negativa
15	BI2	positiva	negativa	negativa	negativa
16	BI3	positiva	negativa	negativa	negativa
17	BI4	positiva	negativa	negativa	negativa
18	BI5	positiva	negativa	negativa	negativa
19	CA1	positiva	negativa	negativa	negativa
20	CA2	positiva	negativa	negativa	negativa
21	CA3	positiva	negativa	negativa	negativa
22	CA4	positiva	negativa	negativa	negativa
23	CA5	positiva	negativa	negativa	negativa
24	CA6	positiva	negativa	negativa	negativa
25	CA7	positiva	negativa	negativa	negativa
26	CA8	positiva	negativa	negativa	negativa
27	CI1	positiva	negativa	negativa	negativa
28	CI2	positiva	negativa	negativa	negativa
29	CI3	positiva	negativa	negativa	negativa
30	CI4	positiva	negativa	negativa	negativa
31	CI5	positiva	negativa	negativa	negativa
32	CI6	positiva	negativa	negativa	negativa

Tabla 1F. Cepas de bacterias ácido lácticas aisladas y sus características de tinción Gram, catalasa, oxidasa, movilidad.